

201004002A

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)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

平成22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23(2011)年3月



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)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

平成22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・感染制御部部长)

平成23(2011)年3月

## 目 次

総括研究報告書：国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備 牧野 正彦（国立感染症研究所） .....	1
分担研究報告書：抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発及び総括 牧野 正彦（国立感染症研究所） .....	7
抗酸菌の病原性と免疫誘導機構 光山正雄（京都大学） .....	13
抗酸菌感染における免疫防御誘導機構 吉開泰信（九州大学） .....	17
薬剤耐性結核菌の迅速検出法 鈴木定彦（北海道大学） .....	21
自然免疫系による結核感染防御機構の解析 竹田 潔（大阪大学） .....	27
抗酸菌感染症と神経障害 後藤正道（国立療養所星塚敬愛園） .....	31
結核菌の分子遺伝学 谷口初美（産業医科大学） .....	35
非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究 後藤義孝（宮崎大学） .....	39
抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する細菌学的・免疫学的な基礎研究 瀧井猛将（名古屋市立大学） .....	43
宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の分子と宿主要因に関する研究 大原直也（岡山大学） .....	47
結核菌・非結核性抗酸菌の遺伝的多様性とその進化・疫学・臨床的意義の解明 岩本朋忠（神戸市環境保健研究所） .....	53
ハンセン病におけるマクロファージの機能解析 福富康夫（国立感染症研究所） .....	57
新規結核ワクチンの開発と応用 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター） .....	61

結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究 小出幸夫（浜松医科大学） .....	67
ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析 長谷 篤（大阪市立環境科学研究所） .....	71
抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究 慶長直人（国立国際医療センター研究所） .....	77
抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究 向井 徹（国立感染症研究所） .....	81
結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究 田村敏生（国立感染症研究所） .....	85
結核疫学解析、結核の臨床研究 松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター） ..	91
結核病態に関する分子生物学的研究 松本壮吉（大阪市立大学） .....	95
抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序 杉田昌彦（京都大学ウイルス研究所） .....	99
抗酸菌における菌体構成成分の動態解析 宮本友司（国立感染症研究所） .....	103
研究成果の刊行に関する一覧表 .....	107

平成22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)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部长)

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）  
総括研究報告書

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

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.

病原性抗酸菌感染症は 20 世紀最大の恐怖を与えた細菌感染症であり、新規発症患者の鈍化が目立っている。しかし、結核は近年では急性転帰をとる症例が増加しており、同時に 20 世紀前半とは疫学的特徴においても大きな変化をもたらされていて、その克服には新たな研究展開が必要となっている。また、結核・ハンセン病の 2 大抗酸菌感染症に加え、ブルーリ潰瘍・MAC 感染症など非結核性抗酸菌感染症も重点的研究が必要となっている。本研究班においては、こうした社会情勢を鑑み、2 大疾患にあくまでも重点を置きつつ、病原性抗酸菌感染症を網羅的に、そして最重点課題と考える研究テーマを選択的に選び研究を展開した。抗酸菌の潜伏・持続感染を誘導する宿主因子及び抗酸菌因子の解明が進み、これまで未知であった潜伏状態にある抗酸菌の同定法に一筋の光が見えた。これまでの研究成果において、日本においては北京株結核菌により発症する症例が圧倒的に多いが、これらの菌は 5 つのサブグループに分類することが可能であり、薬剤耐性を獲得し易い菌株・再燃感染を誘導し易い菌株・アウトブレイクに散見される菌株が存在することが明らかとなった。予防方策の樹立にはワクチンの貢献が大きい、高齢者の再燃性結核を予防するための追加免疫用ワクチンとして用いるべきコンポーネントが明らかにされつつある。さらに、詳細は未知のまま取り残されてきたタイプ 1 T 細胞の活性化機構、特に抗原提示細胞との相互作用を司る分子機構に研究の進展があった。

200 年以上にわたる真摯な研究の積み重ねでも逃れることのできない恐怖を与え続ける抗酸菌を近々に制圧し得る可能性は極めて低い、本年度得られた研究を進展させることは何れは果たせると固く信ずる抗酸菌制圧への重要なかつ確かな道なるものと期待できる。

分担者

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

長谷 篤 (大阪市立環境科学研究所・課長)  
竹田 潔 (大阪大学・教授)  
慶長直人 (国立国際医療研究センター研究所・部長)  
向井 徹 (国立感染症研究所・室長)  
田村敏生 (国立感染症研究所・室長)  
松本智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・部長)  
松本壮吉 (大阪市立大学・准教授)  
杉田昌彦 (京都大学ウイルス研究所・教授)  
宮本友司 (国立感染症研究所・主任研究官)

## A. 研究目的

病原性抗酸菌感染症においては、多剤耐性菌が出現し、その拡大を鑑みると公衆衛生的予防治法や既存の抗結核薬に立脚した治療は、ほぼ限界に至っている。本研究班では、結核菌の発病の機構、感染病態の解明などの基礎的研究に加え、新たな予防方策の開発、迅速診断法の開発、迅速な薬剤耐性菌同定試験法の実用研究を併行させ、包括的な基盤研究を行う。特に、高速解析が可能で入手し易くなったゲノム情報を効率的に利用し、さらに、種々の遺伝子改変マウスを用いた分子免疫学研究技法を取り入れ、新たな展開を図る。培養不能な菌によって発症するハンセン病についても、同様に感染病態の把握に立脚した予防・治療法の新規開発と新規迅速検査診断法を開発を主目的とした分子免疫学的研究を中心に行う。結核菌とらい菌の相同性と相違点を利用した研究も展開する。海に囲まれた日本は、近隣アジア諸国との外交関係なしには存在し得ず、近隣諸国への国際的対応は日本とアジア諸国の科学的併行的進展に必要不可欠である。特に、分子生物学的技法を用いた最新技術を確立し、技術移転を図り、近隣諸国とその手法を共有することは、結核やハンセン病の駆逐を目指す上で、大きな貢献に繋がるものである。こうした観点において、本年度の最重要課題の一つ、結核菌-HIV-1の重複感染の病態生理の解明と、ハンセン病の早期非侵襲性診断に係る技術伝播を図る。また、抗酸菌に既存感染した日本人高齢者への対応、とりわけ発症予防戦略の構築に有用な追加免疫ワクチンの開発において、直接的研究

成果が得られるものと期待される。結核菌およびらい菌の分子細菌学、結核症およびハンセン病の免疫生物学は、種々の細胞内寄生性菌を理解する上で重要な位置を占める。本研究により、基本的な病態機構に新たな理解が深まることは、厚生労働行政への貢献上も高いインパクトを与え、若手研究者の育成にも役立つ。新規抗酸菌ワクチン、新規迅速診断法などの確立は、直ちに国内外で実用化可能と期待できる。アジア近隣諸国研究者を積極的に受け入れ、継続性のある共同研究を樹立する。

## B. 研究方法

結核菌／結核に関する研究：

1. 強い病原性及び抗原性を発揮する結核菌の潜伏性慢性持続感染を誘導する機構を、細菌遺伝子のノックアウト、候補遺伝子産物のリコンビナント蛋白作製等の手法で種々の遺伝子改変マウスを用い解析(光山、谷口、松本壮)。病原性及び抗原性を担う分子の生合成経路の解析(松本壮)
2. ファゴゾーム-ライソゾーム融合阻止・肉芽腫形成・組織傷害などの結核に特徴的病態発現は、自然免疫及び獲得免疫を主体とした宿主応答に依存する。その分子機構を動物モデルを用いて主に分子免疫学的、分子生物学的手法を用いて解明し、発症機構を解明(竹田、小出)。結核菌の自然免疫回避機構を分子レベルで解析(竹田)。新規薬剤開発ターゲットの探索(大原)

3. 抗結核防御免疫応答を司る抗原提示細胞とT細胞を中心とした細胞性免疫応答の誘導と活性化機構を免疫生物学的観点から解析。同時に、予防的及び治療的ワクチンを含めた免疫治療開発基盤を構築（牧野、吉開、田村、杉田、瀧井）。脂質及び糖脂質の免疫制御系を解析するため遺伝子改変マウスを作製（杉田）。BCGワクチンの安全性と亜群の差異を解析（瀧井）
4. 多剤耐性結核菌に対する治療効果を反映する宿主因子の同定（慶長）。異なる主要組織適合抗原を有すマウスによる感受性や病態の違いから、系統発生的なアプローチを試行（岩本）。非結核性抗酸菌のヒトへの病原性をスクリーニングする方法を開発（後藤義）
5. 培養に長期間を要する結核菌の検出を迅速かつ確実にを行う新たな手法を開発し、その特異性を解析（鈴木）
6. BCG非依存性高免疫原性新規予防的及び治療的ワクチンの開発を多方面から遂行（岡田、田村）。サルを用いてワクチン効果を判定（岡田）
7. 結核多発地域での分子疫学から、市中における伝播様式及び結核菌の分化・進化を探り、臨床的対応の方法論を確立（長谷、岩本）。非結核性抗酸菌を含め薬剤耐性を獲得し易い菌を遺伝的相同性及び系統発生的に同定（岩本）
8. リファンピシン耐性結核菌及びMACのリファブチン感受性の検討（松本智）
2. BCGの有効性は26%と報告されている。BCGの欠点を凌駕し、かつらい菌の主要抗原を有効利用し強烈にT細胞活性化能を有するリコンビナントBCGを作製評価（牧野）
3. らい菌の宿主免疫応答誘導機構、とりわけ、らい菌殺戮機構をヒトおよび動物細胞レベルで解析。細胞内寄生機構の解明（福富）
4. 安全かつ安定にEGFPを発現するBらい菌を作製するための新規プロモーターの樹立（向井）
5. 人獣共通感染症としてのらい菌のヒト及び動物への感受性の検討（鈴木）
6. 菌体構成成分特に糖脂質分子の基礎的代謝に影響を及ぼす環境下での構成・構造上の変化を生化学的に解析し、ターゲット分子を同定し、抗酸菌の活動性や潜伏化に関する機能変化を解析（宮本）

倫理面への配慮 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

#### らい菌／ハンセン病に関する研究：

1. ハンセン病の標的組織である末梢神経の侵襲機構について、臨床材料とモデル動物を用い平行して病理学的に解析。ハンセン病末梢神経障害発症モデルを開発（後藤正）

1. BCGがワクチンとして十分な効果をもたらすことができない最大の理由は、BCGが抗原提示細胞内ではファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止することにある。BCGから *UreC* 遺伝子を除去した後、HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入したところ、これまでに



- 作製した全てのリコンビナント BCG と比較して、最も強く抗原提示細胞・ナイーブ CD4 陽性・ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化し、かつ最も効率良くメモリー T 細胞を産生した (牧野)。
2. 結核を制圧するためには、結核菌による宿主免疫応答の制御機構を解明する必要性が高い。結核菌はマクロファージに強い親和性を有するが、結核菌を貪食したマクロファージは、炎症性サイトカインを産生して初期防御に働くとともに、その後の獲得免疫抵抗性を与える。代表的炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$  の産生機構と病原性因子の関係を解析したところ、病原性関連遺伝子領域 RD1 が本サイトカインの産生誘導に深く関与していた (光山)。
  3. BCG の治療的ワクチンとしての有効性を評価するため、膀胱癌に対する BCG 療法の抗腫瘍効果の免疫学的機序を解析した。その結果、IL-17 産生性  $\gamma\delta$  T 細胞が重要な役割を果たし、好中球浸潤を誘導することを明らかにした (吉開)。
  4. ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍の発症機構を解析するため、起因菌が産生する毒性脂質マイクロラクトンの細胞傷害活性を人工合成したマイクロラクトン A/B を用いて検討した。マイクロラクトン A/B は、線維芽細胞とマクロファージのアポトーシスを誘導した (後藤正)。
  5. *M. smegmatis* J15cs 株は、マクロファージの TLR2 を介した生体防御反応を回避し生体内寄生を果たすことが明らかとなった。さらに、J15cs 株の RNA ポリメラーゼの  $\omega$  サブユニットである *rpoZ* 遺伝子は細胞内増殖性に加え、試験管内増殖性及び色素産生性など多彩な機能を果たしていた (谷口)。
  6. 非結核性抗酸菌は広く環境中に存在し、人獣共通感染症の原因菌ともなっている。代表的な愛玩動物である猫では皮膚抗酸菌症を多発させ、時には全身性疾患を誘導する。そこで、ネコマクロファージ系株化細胞を用い起病性を検討し、非結核性抗酸菌のヒト及び他の哺乳動物に対する病原性をスクリーニングする方策を確立した (後藤義)。
  7. 高齢マウスの BCG ワクチンの結核発症予防効果は、若齢マウスのそれとほぼ同程度であった (瀧井)。
  8. 結核菌のチミジル酸合成酵素 ThyX が有する NADPH 酸化活性と cyclic-di-GMP は抗酸菌の生理機能維持に重要な役割を果たしていた。両者は、新規薬剤開発ターゲットとなり得る (大原)。
  9. 日本における *M. avium* の遺伝的多様性を比較検討した。本邦で分離される菌株は欧州諸国からの報告とは異なり、ブタ分離株とは相同性は低く、浴室環境分離株との相同性が高かった。このことから本邦では土着の *M. avium* subsp. *hominissuis* の存在が強く示唆され、特異な遺伝的背景を有し特異的な生態と伝播様式が存在すると考えられた (岩本)。
  10. 細胞内寄生したらい菌の殺戮の機能を解析するため、M-CSF を用い分化誘導したヒト末梢血マクロファージに感染したらい菌を IFN- $\gamma$  を用い処理すると、らい菌の代謝活性が減弱し、NADPH オキシダーゼを構成する phox 蛋白及びリソゾームマーカーはらい菌周囲に集積していた (福富)。
  11. 結核菌殺傷蛋白 Granulysin は、IL-6 と相乗作用を有しつつキラー T 細胞を活性化して、結核菌感染マウスに対して結核治療効果を発揮して、肺・肝・脾臓の結核菌数を減少させた。治療的ワクチンとしての有効性が示唆された (岡田)。
  12. ラテックスビーズファゴゾームをコントロールとして、結核菌ファゴゾームに含まれる蛋白を解析したところ、Erlin-2 が特異的に存在することが明らかとなった。Erlin-2 ノックダウンマクロファージの解析から、結核菌の感染初期における増殖には、Erlin-2

を含む小胞との融合が必要であった（小出）。

- 1 3. 結核菌の迅速かつ簡易な特異性の高い診断法を開発するため、従来の 6 本のプライマーを用いる LAMP 法に改良を加え、2 本のプライマーのみで、かつ 10 個の結核菌を 1 時間以内に検出する方法の開発に成功した。非結核性抗酸菌あるいは抗酸菌以外の細菌は、高濃度 DNA を用いても検出されず極めて特異性が高いことが実証された（鈴木）。
- 1 4. 日本人臨床分離結核菌株は 80% が北京株に属しているが、本邦の北京株はさらに 5 亜系統に細分される。また亜系統は複数の微細系統を内包し、各系統を指示する SNPs は、各亜系統の遺伝マーカーとして活用できることが判明した（長谷）。
- 1 5. 結核菌の病原性を担うと想定されている ESAT-6 及び CFP-10 のマクロファージの機能に及ぼす影響を解析したところ、CFP-10 を恒常的に発現するマクロファージでは BCG 感受性が増大し、病原性因子であることが立証された。しかし、ESAT-6 発現細胞では、そうした感受性増大は観察されず、ESAT-6 と CFP-10 の機能に差異があることが証明された（竹田）。
- 1 6. 多剤耐性結核患者の治療に伴う免疫病態と血液中の免疫関連遺伝子発現の相関性を解析した。末梢リンパ球を結核菌特異抗原で 6 時間刺激すると、IFN- $\gamma$  と CXCL10 が著しく誘導され、両者は高い相関性を示した。しかし、明らかにこれらの遺伝子の誘導が抑制されている症例も存在した（慶長）。
- 1 7. EGFP を安定に発現するらい菌を作製するためには、従来の方法に改良を加える必要があり、そのためには trans 型 integrase 発現用プラスミドを構築することが重要と想定された。本プラスミドを作製し、*M. smegmatis* を用いて検証すると十分機能することが判明した（向井）。
- 1 8. Th1 免疫応答を選択的に誘導し、抗

結核免疫応答を強化することを目的とし、選択的 Th1 免疫応答の誘導機序を分子レベルで解析した。Th1 CD4 陽性 T 細胞の活性化には、IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現が必須であるが、IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現は T-bet あるいは TAF7 に依存せず、サイトカイン非依存的な STAT4 の活性化により調節されていることが判明した（田村）。

- 1 9. 結核菌及び代表的非結核性抗酸菌である MAC のリファンピシン及びリファブチンの薬剤感受性を検討した。リファンピシン耐性結核菌株は、リファブチンによる臨床効果は期待できない。一方、MAC においてはリファブチン感受性菌が存在する可能性が示唆された（松本智）。
- 2 0. リポアラビノマンナン及びリポマンナンは、細胞壁に存在する抗酸菌に特徴的な糖脂質である。高病原性菌と低病原性菌におけるこれら糖脂質の構造が異なっており、そのために免疫原性も異なっている。しかし、その生合成経路は不明な点が多く、今回 MSMEG-4247 (Rv2181) 遺伝子が生合成に深く関与していることが明らかとなった（松本壮）。
- 2 1. 抗酸菌細胞壁に存在する抗酸菌固有の脂質・糖脂質群を利用した診断法及び感染制御法を開発するため、ヒト脂質特異的免疫応答システムを導入し再構築したマウスモデルの作製に成功した（杉田）。
- 2 2. これまで着目されてこなかった菌体内に存在する有機酸やアミノ酸などの基礎代謝系に関わる物質を CE-MS を用い解析すると、らい菌では BCG など他の抗酸菌と比較して、解糖系 TCA サイクル等のエネルギー産生に関わる代謝系化合物が著しく欠落していた。らい菌が細胞内寄生する際、自らが保有する特異な代謝機構を利用していると考えられた（宮本）

#### D. 考察

病原性抗酸菌感染症に対する治療として多剤併用療法が確立されると抗酸菌は多剤耐性菌を生み、自らの生きる方策を搦んだ。抗酸菌に対する宿主の生体防御反応は獲得免疫によって営まれているが、細胞性免疫反応を負に制御する因子を取り除いた遺伝子改変マウスを作製し抗酸菌生体防御反応を強烈にすると、結核菌は負けじと強烈に増殖し個体死を誘導する。宿主と抗酸菌の戦いは永遠に続くことを予感させる。結核菌が活動を休止させ、細胞内にひっそりと眠るようにして生き続ける分子機構の一端が明らかになりつつあるが、この分子をターゲットとしたワクチンあるいは免疫療法が成功した時、結核菌にとって生命を危うくする方策であるならば、賢い結核菌やらい菌はどのような方策を立てて生き延びようとするのであろうか。長い闘いの歴史を考えると抗酸菌は何かの選択をすると思われるが、その選択する道が明らかになれば、それは楽しみの一つである。その一方で、結核菌との戦いの中で本質をついた戦略であるとも考えることもできる。本年度の研究成果が、結核菌との戦いを綴る日記の重要な 1 ページとなることを期待する。また、日米医学協力計画の最大の目的の一つであるアジア諸国との共同研究を積極的に展開させ、その研究成果がアジアの共同研究者から第 14 回汎太平洋新興感染症国際会議で発表された。このことは、本研究班の研究活動が確実に結実していることを示唆している。

#### E. 結論

本研究班は、日本を代表する抗酸菌研究者により組織されており、それぞれが限りある研究費の中で最大限の努力を払い、研究分担者としての自覚を持った研究が展開された。本成果は、日本の抗酸菌研究の成果と言っても過言ではない。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

刊行一覧表の通り質の高い論文が 20 数本発表された。

##### 2. 学会発表

それぞれの研究者の発表は、国内では主に日本細菌学会・日本免疫学会・日本結核病学会・日本ハンセン病学会・日本感染症学会・日本生体防御学会などの総会・学術集会で発表された。国際学会では、第 45 回日米医学協力計画結核ハンセン病専門部会合同会議（米国・ケンブリッジ）・第 14 回汎太平洋新興感染症国際会議（マレーシア・ペナン島）において発表された。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他          なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)



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

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

ハンセン病を誘導するらい菌に対する生体防御反応は、メモリータイプの CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞により営まれており、本反応を賦活するためには、ナイーブ T 細胞を強く活性化しメモリー T 細胞を産生し得るワクチンが不可欠である。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、ハンセン病に対する有効性も 26%と報告されている。そのため、新規リコンビナント BCG の開発が強く求められている。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 T 細胞活性化能を解析した。BCG-D70M は、非常に強く樹状細胞・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 は、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導を可能とした。また、C57BL/6 マウスに皮下接種すると、らい菌の主要抗原の一つである 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、効率的にメモリー T 細胞を産生し、らい菌に対する生体防御反応を賦活し得ることが判明した。

A. 研究目的

病原性抗酸菌に対する生体防御反応を増強するためには、ワクチン効果を有する抗原を用いた抗原特異的メモリー T 細胞の産生が重要である。BCG は結核に対するワクチンとして、幅広く用いられ一定の予防効果を挙げてきた。しかし、近年では、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方策、すなわちメモリー T 細胞の効率的産生法の開発が強く求められている。BCG は、本質的にナイーブ

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するが、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導することができず、改良の余地を残している。BCG に改良を加えるにあたっては、その弱点を凌駕する方策を周到しなければならない。BCG の最大の欠点は、抗原提示細胞に感染した際、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ことにある。したがって、感染した BCG が効率的にライソゾームへ移行する方策を樹立することが重要となる。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の融合を容易にした。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状況を作出することであった。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。二つの方策は何れも有効であって、*UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ 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 T 細胞活性化能とメモリー T 細胞の産生能を検討した。

## B. 研究方法

*UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG 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、抗 CD3 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リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、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、抗 CD4 抗体

あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、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 MHC 抗原に対する抗体および CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。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-D70M 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) を皮下接種し、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、細胞内に IFN- $\gamma$  を産生している細胞を FACSCalibur を用いて測定し算出した。

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

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 (HSP70-MMP-II 遺伝子導入 *UreC*

保有 BCG) を用いて、BCG-D70M のナイーブ T 細胞の活性化能を検討した。BCG-D70M は、最も強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化させた。BCG-D70M はマクロファージを介してもメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。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、同時に 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 の T 細胞活性化機構を解析するため、BCG-D70M の抗原提示細胞活性化能を評価した。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。樹状細胞からの IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$  の産生誘導も同様であった。さらに、BCG-D70M は樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。BCG-D70M による T 細胞活性化機構をより詳細に検討する目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後 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、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。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型 T 細胞が産生され、さらに、遊走能マーカーを有するメモリー 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、全てのコントロール 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。その効果は長期持続した。

#### D. 考察

らい菌に対する生体防御反応を賦活するためには、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が必須である。そのためには有効なワクチンが必要となる。ワクチンとして用いられてきた現行の BCG では、どちらの T 細胞をも強く活性化する能力が弱く、そのため改善が求められている。T 細胞を充分活性化し得ない最大の原因は、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、二つの大きな試みを行ってきた。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ところ、CD4 陽性 T 細胞を強く活性化し、メモリー CD4 陽性 T 細胞の産生が可能となった。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 を融合させファゴゾームの中で分泌させると、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、両方法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、*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。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-ΔUT-11-3 あるいは 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

らい菌に対する生体防御反応を賦活し得るメモリー T 細胞の産生の強化を目的として、*UreC* 遺伝子除去 BCG に HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入し、新たにリコンビナント BCG を作出した。本 BCG は、長期間メモリー CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を産生した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 306: 103-109.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific

glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 192: 5700-5708.

- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 185: 6234-6243.
  - 4) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. *Clin. Infect. Dis.*, in press.
- #### 2. 学会発表
- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. 26-30 September, 2010, Lugano, Switzerland.
  - 2) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 3) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and Phox expression in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy



- Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 4) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 5) Mukai, T., Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Expression of the fluorescent protein in *Mycobacterium leprae*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 6) Miyamoto, Y., and M. Makino. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 7) 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 藤原永年, 水野淨子, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex 血清型 4 型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 8) 向井 徹, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 抗酸菌ファミリー TM4 に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 9) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 抗酸菌 *rpoB* 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 10) 前田百美, 田村敏生, 甲斐雅規, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 11) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現と phox タンパクの動態. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
  - 12) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. クロファジミンによる細胞死誘導の機序. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 13) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌のリポペプチドによる抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 14) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 牧野正彦. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 15) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 抗酸菌ファミリープロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
  - 16) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. Major Membrane Protein (MMP)-II 血清抗体価とハンセン病の病型について. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- 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22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)

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

光山 正雄

(京都大学・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）  
分担研究報告書

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

研究分担者 光山 正雄 （京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・教授）  
研究協力者 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.

本研究では、結核菌 H37Rv 株、病原性関連遺伝子領域 RD1 欠損株( $\Delta$ RD1) および $\Delta$ RD1 に RD1 領域を相補した株 ( $\Delta$ RD1::RD1)をマクロファージに感染させ、その後のサイトカイン産生応答を調べてサイトカイン産生誘導における RD1 の重要性について解析を行った。マクロファージに H37Rv を感染させると、強い IL-1 $\alpha$ 産生が誘導された。しかし、 $\Delta$ RD1 感染では IL-1 $\alpha$ 産生はほとんど認められなかった。一方、 $\Delta$ RD1::RD1 感染では、H37Rv 感染と同様に IL-1 $\alpha$ の強い産生が誘導された。さらに、これら 3 菌株の間には IL-12p40 産生誘導能に違いは認められなかった。これらの結果から、RD1 は結核菌感染マクロファージからの IL-1 $\alpha$ 産生に重要であることが示された。さらに解析を進めたところ、H37Rv と $\Delta$ RD1 感染後の IL-1 $\alpha$  mRNA の発現量および proIL-1 $\alpha$ 産生量に違いはなかったが、培養上清中に分泌される mature IL-1 $\alpha$ 量は H37Rv 感染に比較して $\Delta$ RD1 感染で明らかに低いことが示された。また、H37Rv 感染ではカルパインの活性化が誘導され、IL-1 $\alpha$ 産生はカルパイン阻害剤により抑制されること、さらに、H37Rv 感染で誘導される IL-1 $\alpha$ の分泌は EGTA や BAPTA で抑制され、カルシウムイオンフォア存在下でマクロファージに $\Delta$ RD1 を感染させると、mature IL-1 $\alpha$ の分泌が亢進することが示された。以上の結果から、RD1 は感染マクロファージにカルシウムの流入を引き起こし、その結果カルパインが活性化することで IL-1 $\alpha$ の分泌に関与することが明らかとなった。

A. 研究目的

結核菌は宿主に感染しても多くの場合発症せず、そのまま長期間に渡り体内で生存し続ける。一方、感染宿主では結核菌の感染直後より自然免疫応答が惹起され、数週間後には特異的な防御免疫が発現する。しかし、この宿主免疫応答は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できない。結核を撲滅するためには、結核菌の感染により誘導される宿主防御免疫応答の全体像を明らかにするとともに、結核菌による宿主応答の制御メカニズムを解明することが重要である。

結核菌は、宿主体内に侵入後速やかに感

染局所に動員されるマクロファージに貪食される。しかし、菌はマクロファージの殺菌機構に抵抗して細胞内で生存増殖する。一方、結核菌に感染したマクロファージは様々な炎症性サイトカインを産生して、初期防御に働くとともにその後の獲得抵抗性の発現に深く関わっている。最近、各種遺伝子欠損マウスの結核菌に対する抵抗性の解析から、MyD88 および IL-1R 欠損マウスの結核に対する感染防御能が IFN- $\gamma$ 欠損マウスと同様に低下していることが明らかにされた。MyD88 は IL-1R のシグナル伝達に関与する重要な細胞成分であり、この結果は IL-1 が結核菌感染に対する防御免疫の

発現に重要な役割を果すことを示唆するものである。これまでの解析で、結核菌感染後の IL-1 $\beta$ 産生は菌の病原性関連遺伝子領域 RD1 に依存することが明らかにされている。IL-1 $\beta$ は感染細胞内で活性化されたカスパーゼ 1 による成熟化を受けて培養上清中に分泌される。このカスパーゼ 1 の活性化は、RD1 依存的なカリウムイオンの流出によることがわかっている (Infect. Immun. 77: 3992-4001, 2009)。一方、結核感染により誘導される IL-1 $\alpha$ 産生の詳細な分子機序については不明点が残っている。そこで本研究では、結核菌感染マクロファージからの IL-1 $\alpha$ 産生機序について、特に菌の病原性と関わりの深い RD1 領域と IL-1 $\alpha$ 産生誘導の関係に注目して解析を行い、RD1 が IL-1 $\alpha$ 産生誘導において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

## B. 研究方法

### サイトカイン産生

C57BL/6 マウスの腹腔に 3%チオグリコレートを注射し、3 日後に腹腔滲出細胞を回収した。96 穴または 48 穴組織培養用プレートで 2 時間培養し、洗浄後付着細胞をマクロファージとして実験に使用した。マクロファージに結核菌 H37Rv 株、RD1 欠損株( $\Delta$ RD1) および  $\Delta$ RD1 に RD1 領域を相補した株( $\Delta$ RD1::RD1)を MOI = 5 で感染させ、IL-1 $\alpha$  遺伝子の発現量を経時的に RT-PCR で解析した。また、結核菌感染後経時的に感染マクロファージの破砕物および培養上清を回収し、proIL-1 $\alpha$ 、mature IL-1 $\alpha$  および IL-12p40 産生量を ELISA またはウエスタンブロット法で定量的に解析した。さらに、カルパイン阻害剤である MDL、ALLN や EST、またはカルシウムキレーターである BAPTA や EGTA を培養系に添加し、それら薬剤の IL-1 $\alpha$ 産生への影響を調べた。

### カルパインの活性化

$\alpha$ -フォデュリン(240kD)はカルパインの内因性基質であることが知られている。そこで、結核菌感染後のカルパインの活性を測定するため、経時的に培養上清を回収し、

カルパインによる $\alpha$ -フォデュリンの分解産物(145kD)の量をウエスタンブロット法で解析した。

### 細胞死の測定

マクロファージに結核菌を感染させ、経時的に培養上清を回収した。上清中に遊離した乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH)量を測定し、感染細胞の細胞死の程度を判定した。

### 細胞内カルシウム濃度の測定

マクロファージに結核菌を感染させ、経時的に細胞を回収した。マクロファージ内のカルシウム濃度は、Fluo-4 NW calcium assay kit で測定した。

### 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

### 結核菌感染後のサイトカイン産生応答

マクロファージに H37Rv を感染させると、培養 6 時間後には培養上清中に有意な mature IL-1 $\alpha$ 産生が認められ、その産生量は時間経過とともに増加した。しかし、 $\Delta$ RD1 感染では培養上清中への mature IL-1 $\alpha$ 産生は認められなかった。一方、 $\Delta$ RD1::RD1 感染では、H37Rv 感染と同様に mature IL-1 $\alpha$ の産生が誘導された。さらに、これら 3 菌株の IL-12p40 産生誘導能に違いは認められなかった。これらの結果から、mature IL-1 $\alpha$ 産生には RD1 が重要な役割を果すことが示された。さらに結核菌感染後、経時的に IL-1 $\alpha$ 遺伝子発現量を調べたところ、これら 3 種の結核菌株の感染で誘導される IL-1 $\alpha$  mRNA レベルに違いは認められなかった。また、細胞破砕物中に含まれる proIL-1 $\alpha$ 産生量にも違いはなかった。これらの結果から、結核菌の RD1 は IL-1 $\alpha$ の遺伝子発現ではなく、その成熟化および培養上清への分泌に関与することが示された。

### RD1 依存的カルパインの活性化と mature IL-1 $\alpha$ 産生

IL-1 $\alpha$ の成熟化にはカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが関与するこ