

とが報告されている。そこで、結核菌感染で誘導される IL-1 $\alpha$ 産生誘導にもカルパインが関与するか否かを明らかにするため、感染後の IL-1 $\alpha$ 産生への各種カルパイン阻害剤の影響を調べた。その結果、カルパインの活性を阻害することにより培養上清中の IL-1 $\alpha$ 産生量は著しく低下した。また、この IL-1 $\alpha$ 産生はカルパインの活性化を阻害するカルシウムキレーター(EGTA および BAPTA)を培養系に添加することにより抑制されることが明らかとなった。さらに、結核菌感染後のカルパインの活性化を、その内因性基質である $\alpha$ -フォデュリンの分解産物の量を指標にして解析したところ、 $\Delta$ RD1 はカルパインを活性化する能力が H37Rv に比べて弱いことが示された。また、 $\Delta$ RD1::RD1 は H37Rv と同様にカルパインを活性化したことから、RD1 はカルパインの活性化を誘導して IL-1 $\alpha$ 産生に関与することが明らかとなった。一般に、カルパインの活性化は細胞内カルシウム濃度の上昇により誘導される。そこで、結核菌感染後のマクロファージ内カルシウム濃度を経時的に測定した。その結果、H37Rv および  $\Delta$ RD1::RD1 の感染では感染 6 時間後には明らかなカルシウム濃度の上昇が認められたが、 $\Delta$ RD1 感染では認められなかった。また、マクロファージからの IL-1 $\alpha$ 産生誘導能が低い  $\Delta$ RD1 をカルシウムイオノフォア存在下にマクロファージに感染させると、IL-1 $\alpha$ 産生が有意に亢進することが示された。これらの結果から、RD1 は結核菌感染後に細胞質内へのカルシウムの流入を引き起こし、その結果としてカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが活性化され IL-1 $\alpha$ の成熟化と分泌が誘導されることが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究では、結核菌の病原性に重要な RD1 遺伝子領域と感染マクロファージの IL-1 $\alpha$ 産生との関係についての解析を行った。その結果、RD1 欠損株でも proIL-1 $\alpha$ は合成されるが、最終的な mature IL-1 $\alpha$ への成熟化と細胞外への分泌には RD1 が必要になるこ

とが示された。RD1 領域には、結核菌の分泌装置(ESX1 システム)および分泌因子(ESAT-6 および CFP-10)がコードされており、この ESX1 システムにより分泌される様々な因子が菌の病原性に重要な役割を果たすものと考えられている。本研究で示したように、結核菌感染マクロファージでは RD1 依存的にカルシウムの流入が起こることから、ESX1 システムを介して分泌された因子がカルシウムの流入に関与することが示唆される。また昨年度の解析から、RD1 はカリウムイオンの流出にも関与し、カスパーゼ 1 の活性化を誘導することが示されている。これら感染に伴うカルシウムやカリウムイオンの乱れは、サイトカインの誘導に必要となる一方で、細胞死を引き起こすことで菌の病原性にも関連する。さらに、結核菌はマクロファージに食食された後ファゴソームにトラップされるが、その中の環境を自身の生存に適したものに変えて細胞内で生存する。従って、結核菌はファゴソーム内から ESX1 システムを利用して細胞質に結核菌因子を分泌するものと考えられる。その機序は未だに明らかにされていないが、結核の病態形成の解明に繋がる重要な点であると考えている。

結核菌の感染では RD1 依存的に細胞内カルシウム濃度が長時間に渡って上昇する。この機序は不明であるが、カルパインの持続的な活性化を引き起こすものと考えられている。カルパインは $\alpha$ -フォデュリンをはじめとする細胞骨格を形成するタンパク質や細胞膜結合タンパク質を分解する。このため、カルパインの活性化は細胞死の直接の原因となる。本研究結果が示すように、IL-1 $\alpha$ の成熟化は活性型カルパインに依存する。しかし、その分泌量は LDH の放出と強い相関関係が認められることから、単に細胞膜の崩壊や細胞死に依存した遊離が分泌の本態である可能性は否定出来ない。一方、IL-1 $\alpha$ の産生はカスパーゼ 1 に依存するとの報告もある(Cell 132: 818-831, 2008)。さらに、IL-1 $\alpha$ に加えて IL-1 $\beta$ や IL-18 の分泌機序についても未だに解明されていない。RD1 に依存したこれらサイトカインの細胞

外への分泌機序と細胞死の関係を明らかにできれば、それが感染に伴う炎症反応の制御に重要な知見になると考えている。

#### E. 結論

結核菌感染マクロファージからの IL-1 $\alpha$  産生には病原性関連遺伝子領域 RD1 が重要で、RD1 は細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導してカルパインを活性化する。その結果、proIL-1 $\alpha$  は mature IL-1 $\alpha$  に成熟化し、培養上清中に産生されることが示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sakai, S., I. Kawamura, T. Okazaki, K. Tsuchiya, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. 2010. PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Int. Immunol., 22: 915-925.

##### 2. 学会発表

- 1) Sakai, S., I. Kawamura, and M. Mitsuyama. PD-1 inhibitory signal is required for an orchestrated protective immunity to

*Mycobacterium tuberculosis* in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.

- 2) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. PD-1 inhibitory receptor prevents immunopathological responses in murine tuberculosis. The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.

- 3) 河村伊久雄, 楊瑞麗, 陳曦, S. R. Dewamitta, 酒井俊祐, 土屋晃介, 原英樹, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの interleukin-1 $\alpha$  産生における結核菌病原性関連遺伝子領域 RD1 の役割. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会 2010 年 11 月 枚方

#### 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)

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

吉開 泰信

(九州大学・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

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

研究分担者 吉開 泰信（九州大学生体防御医学研究所・教授）

研究要旨.

IL-17 は T 細胞由来炎症性サイトカインであり、近年 IL-17 産生 CD4 ヘルパー T 細胞サブセット (Th17) が自己免疫疾患に直接関わることで明らかとなり注目を浴びている。一方、正常な個体において存在する IL-17 産生細胞は主に  $\gamma\delta$  T 細胞であり、肺、腹腔、腸管粘膜などの末梢組織に多く存在する。我々は *Mycobacterium bovis* BCG 感染マウスモデルを用いた研究において、腹腔内投与では腹腔内で、気道感染では肺で、 $\gamma\delta$  T 細胞が感染早期に IL-17 を産生し、好中球浸潤を誘導することを明らかにした。今回、BCG を膀胱内に投与して早期に  $\gamma\delta$  T 細胞が IL-17 を産生し、好中球浸潤を誘導すること、膀胱癌に対する BCG 療法の抗腫瘍効果において、この IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞が重要であることを明らかにした。さらに常在性 IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は胎生期胸腺ですでに機能分化しており、特異的に HES1 を高く発現しており、遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの解析により、IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞胸腺における機能分化に HES-1 が必須の分子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

IL-17 は T 細胞由来炎症性サイトカインであり、近年 IL-17 産生 CD4 ヘルパー T 細胞サブセット (Th17) が自己免疫疾患に直接関わることで明らかとなり注目を浴びている<sup>1)</sup>。一方、正常な個体において存在する IL-17 産生細胞は主に  $\gamma\delta$  T 細胞であり、我々は先に大腸菌腹腔内感染マウスモデルを用いた研究において腹腔内常在性  $\gamma\delta$  T 細胞が感染早期に IL-17 を産生し、好中球浸潤を誘導することで感染初期防御に関与していることを報告した。<sup>2,3)</sup> さらに IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は胸腺において機能分化を果たしていることが明らかとなった。<sup>4)</sup> 本研究では IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞のマイコバクテリア感染症での役割を膀胱癌の BCG 療法において抗腫瘍効果について解析した。さらにその胸腺での機能分化機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

C3H/HeN マウス、C57BL/6 マウス、

Tie2-Cre トランスジェニック (Tg) マウス、MX1-Cre Tg マウス、STAT3 flox/flox マウス、ROR $\gamma$ t ノックアウト (KO) マウス、C $\delta$  KO マウス、HES1 KO および HES1 flox/flox マウス (京都大学影山龍一郎先生より分与)、IL-17KO マウス、IL-17 レポーターマウス (東京大学岩倉洋一郎先生より分与) を用いた。膀胱腫瘍として C3H/He 由来 MT-2, C57BL/6 由来の B16, MB49 を用いた。 $\gamma\delta$  T 細胞のサイトカイン産生は PMA/Ionomycin 刺激後、細胞内染色法によりフローサイトメーターで解析した。ELISA で膀胱組織の上清のサイトカインを測定した。mRNA の発現は real-time PCR 法により解析した。

C. 研究結果

1) BCG の抗膀胱腫瘍機序

BCG Connaught strain (Immucyst, kindly provided by Nippon kayaku, Tokyo, Japan)  $3 \times 10^6$  CFU を BCG を膀胱内に投与すると 1 日目から膀胱粘膜に好中球が

浸潤してきた。BCG の 1 週間毎の繰り返し投与によって好中球のさらなる増加が認められた。次に膀胱粘膜での IL-17 の産生を ELISA で調べたところ、IL-17 の産生が BCG 投与 1 日目から検出されるようになり、5 日まで継続された。好中球浸潤における IL-17 の重要性を確かめるために、IL-17

ノックアウト(KO)マウスに BCG を膀胱内に投与して好中球の浸潤を調べると、IL-17KO マウスで有意に好中球の浸潤が低下していた。このことから BCG の膀胱接種により産生される IL-17 が好中球浸潤に重要な役割を担っていることが明らかになった。次に IL-17 産生細胞を細胞内サイトカイン FACS で解析した。BCG を 1 週間毎 3 回投与して 22 日の膀胱粘膜浸潤細胞を PMA/ION で刺激して調べたところ、IL-17 産生細胞の大部分が  $\gamma\delta$  型 T 細胞であった。さらに C $\delta$  KO マウスに BCG を接種したところ、IL-17 の産生と好中球の浸潤が著しく低下した。一方、抗 CD4 抗体処理マウスや抗 NK1.1 抗体処理マウスでは BCG 接種後の IL-17 産生と好中球浸潤が減少しなかったことから、BCG 接種による IL-17 産生と好中球浸潤は IL-17 産生  $\gamma\delta$  型 T 細胞が重要であることが明らかとなった。

次に  $1 \times 10^5$  MB49 膀胱腫瘍を接種して、1, 8, 15, 22 日目に  $3 \times 10^6$  CFU の BCG を膀胱内に投与すると生存日数が有意に延長した。抗 Gr1 抗体ではその延長がなくなり、IL-17KO マウスでも BCG による生存延長が認められなかった。C $\delta$  KO マウスでも BCG の抗腫瘍効果が認められなかった。以上の結果から BCG の抗膀胱腫瘍効果は IL-17 産生  $\gamma\delta$  型 T 細胞によって担われることが明らかとなった。

## 2) IL-17 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の分化機構

成体マウスにおいて IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は脾臓、肺、腹腔内、腸粘膜固有層に認められ、特に子宮上皮内  $\gamma\delta$  T 細胞はほぼすべて IL-17 産生能を有していたが、皮膚や腸管上皮間に局在する  $\gamma\delta$  T 細胞は IL-17 産生能を有していなかった。一方胎児胸腺ではすべての  $\gamma\delta$  T 細胞レパトアが IL-17 産生能を有していた。Th17 細胞分化に必須の転写因子である STAT3 および ROR $\gamma$ t 欠損マウスの胸腺では IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は野生型マウスと同程度存在していた。IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞 clone を作製し網羅的解析 (九州大学藤博幸先生との共同研究) を行った結果、Notch シグナルのターゲット分子のひとつである HES1 の発現が IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞 clone 特異的に高かった。IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は特異的に HES1 および Notch1 を発現していた。HES1 欠損マウスでは IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞分化が著しく低下し、HES1 の過剰発現により  $\gamma\delta$  T 細胞からの IL-17 産生が誘導された。

## D. 考察

1976 年に、Morales らによって膀胱癌への BCG 療法が報告されて以来、<sup>5)</sup> 30 年以上もその機序は不明であった。最近、膀胱に浸潤してくる好中球が TRAIL を介して抗腫瘍効果を示すことが報告された<sup>[6, 7]</sup>。今回の結果から IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞が BCG 投与直後から IL-17 を産生して好中球を浸潤させることで抗腫瘍効果を担うことが明らかとなった。感染直後から IL-17 が産生されることから、この反応は TCR を介するものではなく、IL-23 などのサイトカインによる bystander な応答と推測している。実際、我々は大腸菌感染での腹腔内に存在する IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞が IL-23 に反応して IL-17 を産生することを明らかにしている。

末梢組織において分化誘導される Th17 細胞とは異なり、自然発生 IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は STAT3、ROR $\gamma$ t 非依存性に胸腺に

て IL-17 産生能を獲得することが明らかとなった。さらに我々は自然発生 IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞の機能分化には HES1 が必須であることを見いだした。HES1 の IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞の機能分化 機構は不明であるが、HES-1 は転写抑制因子として知られており<sup>8)</sup>、IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞が分化途中の細胞である可能性も示唆されており、Th1 細胞分化への抑制にはたらいっている可能性も考えられる。今後 HES1 をターゲットとした IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞の選択的機能制御による感染症治療への応用が期待される。

#### 参考文献

1. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009. 27: 485-517.
2. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., and Yoshikai, Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J. Immunol.*, 2007, 178: 4466-4472.
3. Nakamura R., Shibata K., Yamada H., Shimoda, K., Nakayama K., and Yoshikai Y. Tyk2-signaling plays an important role in host defense against Escherichia coli through IL-23-induced IL-17 production by  $\gamma\delta$  T cells. *J. Immunol.*, 2008. 81: 2071-2075.
4. Shibata K., Yamada, H., Nakamura, R., Sun, X. Itsumi M., and Yoshikai, Y. Identification of CD25+CD122-  $\gamma\delta$  T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers. *J. Immunol.*, 2008. 181: 5940-5947.
5. Morales, A., Eidinger, D., and Bruce, A. W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 1976. 116: 180-183.
6. Suttman, H., Riemensberger, J., Bentien, G., Schmaltz, D., Stockle, M., Jocham, D., Bohle, A., and Brandau, S. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res.*, 2006. 66: 8250-8257.
7. Kemp, T. J., Ludwig, A. T., Earel, J. K., Moore, J. M., Vanoosten, R. L., Moses, B., Leidal, K., et al. Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood*, 2005. 106: 3474-3482.
8. Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N., and Kageyama, R. The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev.*, 1999. 13: 1203-1210.

#### E. 結論

膀胱癌に対する BCG 療法において、膀胱内に BCG 投与することで早期に IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞が IL-17 を産生し、好中球浸潤を誘導して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに常在性 IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞は胎生期胸腺ですでに機能分化しており、特異的に HES1 を高く発現しており、遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの解析により、IL-17 産生  $\gamma\delta$  T 細胞胸腺における機能分化に HES-1 が必須の分子であることが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeuchi A., T. Dejima, H. Yamada, K. Shibata, R. Nakamura, M. Eto, T. Nakatani, S. Naito, and Y. Yoshikai. IL-17 production by  $\gamma\delta$  T cells is important for the antitumor effect

of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin treatment against bladder cancer. *Eur. J. Immunol.*, in press.

## 2. 学会発表

- 1) Shibata, K., H. Yamada, T. Sato, H. Hara, S. Yamasaki, R. Kageyama, Y. Iwakura, H. Toh, and Y. Yoshikai. The Basic Helix-Loop-Helix protein HES1, is required for the differentiation of naturally occurring interleukin (IL)-17- producing  $\gamma\delta$  T cells. 14th International Congress of

*Immunology*. August, 2010 Kobe.

- 2) Takeuchi, A., H. Yamada, K. Shibata, and Y. Yoshikai. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells are important for the antitumor effect of bovis bacillus Calmette-Guérin treatment against bladder tumor. 第 69 回日本癌学会 2010 年 9 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)

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

分担研究報告書

研究分担者

鈴木 定彦

(北海道大学・教授)



## 薬剤耐性結核菌の迅速検出法

研究分担者 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）  
研究協力者 中島 千絵（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教）

### 研究要旨.

これまでに多くの研究グループから核酸増幅法を応用した結核の迅速診断法が報告され、一部は実用化されている。アジア、アフリカ等で実際に応用可能と思われる検査法はLoop mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用したものである。LAMP法は等温で遺伝子増幅が出来るために、高価な機械を必要とせず、また、蛍光物質を用いた方法では結果を可視化できるため、反応後に直接判定が可能である。しかしながらLAMP法では6本のプライマーを用いる事から非特異反応（擬陽性）が見られる事がある。本研究では、LAMP法の長所をそのままに残してプライマー2本のみで *Mycobacterium tuberculosis* のDNAを検出できる等温遺伝子増幅法の開発を目指した。ターゲットとして全ての *M. tuberculosis* が保有する事が知られているDirect repeat領域を選択して、これに対してデザインしたプライマーを用いたところ、10個の *M. tuberculosis* を1時間以内に検出できる等温遺伝子増幅法の構築に成功した。また、非結核性抗酸菌および抗酸菌以外の細菌に対しては高濃度DNAを用いた場合でも非特異反応が認められず、特異性の高い事が証明された。本研究で開発した等温増幅法は感度および特異性に優れたものであり、その簡便性から臨床応用も容易なものと考えられる。今後、臨床検体を用いた評価を通じてその有用性を検証してゆく必要があるものと考えられる。

### A. 研究目的

結核の早期診断とこれに引き続いた早期の治療開始は結核のさらなる増加を未然に防ぎ、ひいては、結核の減少を導く事の出来る重要な課題である。多剤耐性結核の対策のためにも迅速な結核菌検査は要求される。通常結核の細菌学的検査では、臨床材料を塗抹し、抗酸菌染色後に鏡検する。この方法が、患者発見の重要な簡便かつ迅速な手段の一つであるが、検出感度は分離培養法や核酸増幅法と比べて劣る。また、この方法では抗酸菌として同定されるのみであり、治療方針決定のためには、更なる種鑑別が必要である。培養検査では、結核菌の分裂速度の遅さに起因する培養時間の長さが迅速診断の障害となる。検体からの通常細菌の培養に要する時間が約1日であ

るのに対して、結核菌の培養には約1ヶ月間を要する。これに加えて、培養菌体を用いた菌種同定検査も極めて煩雑であるため、培養検査を用いる限り迅速診断は可能とならない。

これまでに多くの研究グループから核酸増幅法を応用した迅速診断法が報告され、一部は実用化されている。アジア、アフリカ等に置いて実際に応用可能と思われる検査法はLoop mediated isothermal amplification (LAMP) 法を応用したものである。LAMP法は等温で遺伝子増幅が出来るために、高価な機械を必要とせず、また、蛍光物質を用いた方法で可視化できるため、反応後に直接判定が可能である。しかしながらLAMP法では6本のプライマーを用いる事から非特異反応（擬陽性）が見られる事

がある。本研究では、LAMP法の長所をそのままにプライマー2本で結核菌のDNAを検出できる等温遺伝子増幅法の開発を目指した。

## B. 研究方法

### 対象

*M. tuberculosis* H37Rv、*M. tuberculosis* 臨床分離株、*M. bovis* BCG Tokyo、*M. intermedium*、*M. lentiflavum*、*M. mucogenicum*、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. simiae*、*M. asiaticum*、*M. scrofulaceum*、*M. szulgai*、*M. gordonae*、*M. xenopi*、*M. nonchromogenicum*、*M. terrae*、*M. malmoense*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. shimoidei*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus* および *M. smegmatis* の抗酸菌、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae* および *Legionella pneumophilla* の非抗酸菌を用いた。DNAはビーズ破壊法で抽出した。

### 新規等温遺伝子増幅法の検討

*M. tuberculosis* の Direct repeat 領域をターゲットとしてプライマーをデザインした。反応液組成として、20mM Tris-HCl (pH8.8)、10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Tween 20、0.5M betaine、0.36mM dNTP、6mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、8U Bst polymerase および 1.6 μM primer (表1) を用いた。反応温度は 68°C として、リアルタイム濁度計を用いて濁度の変化を追跡した。また、上記反応液に 1 μl の Fluorescein Detection Reagent を添加して反応させ、色調の変化と蛍光強度の変化を観察した。

表1 本研究に使用したプライマー

primer	sequence 5'-...-3'
DRa-21	CGGGGTTTTGGGTCTGACGAC
DRb-19	CCCGAGAGGGGACGGAAC

### 非特異反応の検討

上述した非結核性抗酸菌および抗酸菌以外の細菌から抽出したDNAを対象として本研究の新規遺伝子増幅法を試験した。それぞれの菌のDNAは1反応当り50ng使用し、全ての反応は、上述の通り実施した。反応

の観察はリアルタイム濁度計を用いた。

## C. 研究結果

*M. tuberculosis* H37Rv を用いた研究において良好な等温増幅を得た。次に、Direct repeat の数の異なる *M. tuberculosis* 臨床分離株 (北京ファミリー、リピート数16) および *M. bovis* BCG Tokyo 株 (リピート数48) を標的として新規等温遺伝子増幅法の性能を評価した。リアルタイム濁度計を用いて濁度の変化を追跡し、濁度 (600nmにおける吸光度) が 0.1 に達した時間をスレッシュホールド時間として、これを両者で比較した結果、どちらを標的とした場合も1時間以内に50fgを検出する事が可能であった (表2)。

表2 Direct repeat のリピート数とスレッシュホールド時間

DNA量	リピート数	
	48	16
50ng	15m36s	23m06s
5ng	17m06s	24m36s
500pg	19m18s	28m24s
50pg	21m48s	31m00s
5pg	25m12s	36m18s
500fg	31m48s	39m06s
50fg	41m24s	44m52s
NC	検出せず	検出せず
m:分、s:秒		

上記、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により展開し、エチジウムブロマイドにより染色した分析結果を図1に示す。図中には一定間隔 (約70塩基対) のラダー形成が見られていた。また、産物は予想される長さを遥かに超えるものも見られた。

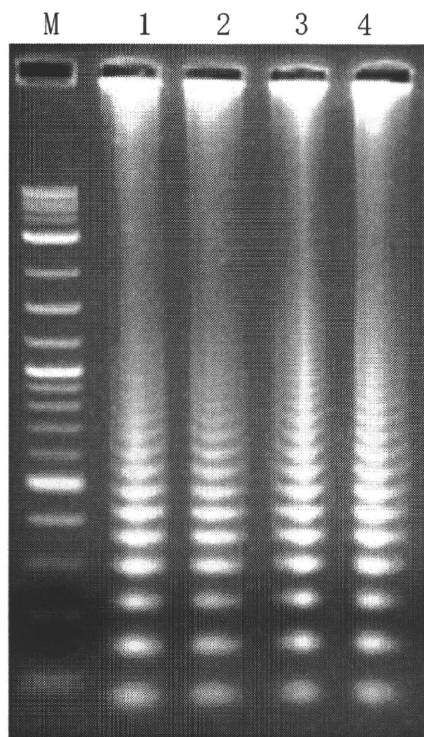


図1 新規等温遺伝子増幅法による増幅産物

M: 100bp ラダーマーカー、1: 新規等温遺伝子増幅法による増幅産物(添加結核菌 DNA、50pg)、2: 新規等温遺伝子増幅法による増幅産物(添加結核菌 DNA、5pg)、3: 新規等温遺伝子増幅法による増幅産物(添加結核菌 DNA、500fg)、4: 新規等温遺伝子増幅法による増幅産物(添加結核菌 DNA、50fg)

簡便な検査を実現するためにはアガロース電気泳動等を用いた遺伝子増幅産物の検出は現実的とは言えない。そこで我々は、蛍光試薬 Fluorescein Detection Reagent を添加して反応させ、色調の変化と蛍光強度の変化を観察した。その結果を図3に示す。

新規等温遺伝子増幅反応が陽性となった場合には自然光の下において反応液は緑色を呈した。一方、陰性対象では反応前と同一のオレンジ色であった。また、新規等温遺伝子増幅反応が陽性となった場合には紫外線照射下で反応液は強い蛍光を示した。*M. tuberculosis* 臨床分離株(北京ファミリー、リピート数 16) および *M. bovis* BCG Tokyo 株(リピート数 48) を用いた実験では、自然光下、紫外線照射下の何れにおいてもその検出限度は 50fg であった。

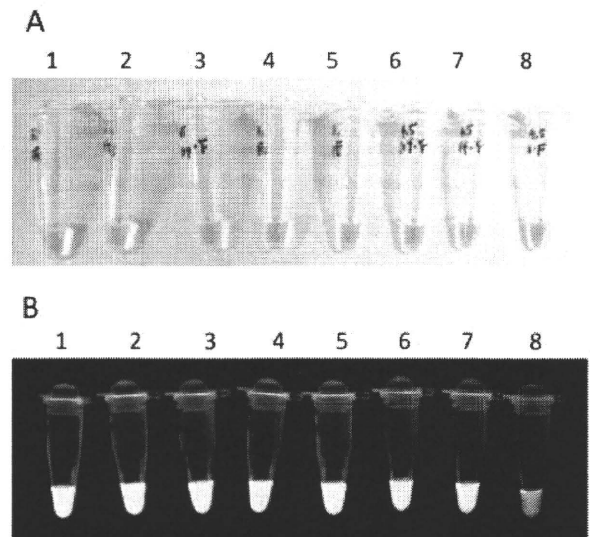


図2 新規等温遺伝子増幅法の目視による結果判定

A: 自然光下での観察、B: 紫外線照射下での観察。  
標的 *M. tuberculosis* DNA 量 1: 50ng、2: 5ng、3: 500pg、4: 50pg、5: 5pg、6: 500fg、7: 50fg、8: 陰性対象

次に、非特異反応の有無を検討するために *M. intermedium*、*M. lentiflavum*、*M. mucogenicum*、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. simiae*、*M. asiaticum*、*M. scrofulaceum*、*M. szulgai*、*M. gordonae*、*M. xenopi*、*M. nonchromogenicum*、*M. terrae*、*M. malmoense*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. shimoidei*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus* および *M. smegmatis* の非結核性抗酸菌および *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Legionella pneumophilla* の抗酸菌以外の細菌より抽出した DNA を対象に新規遺伝子増幅法を試みた。

#### D. 考察

本研究では、全ての *M. tuberculosis* が共通に保有する Direct repeat 領域を標的として新たな等温遺伝子増幅法を構築した。本音遺伝子増幅法は 68°C の等温で 1 時間以内に 50fg の *M. tuberculosis* の DNA 中に存在する Direct repeat 配列を検出する事が出来た。結核菌のゲノムの長さから算出すると 1 ゲノムの重さは 5fg である事から、10 個の *M. tuberculosis* 菌体から効率良く

DNA が検出された場合にはこれを検出する事が可能であると言える。通常の塗抹陽性患者検体 1ml 中には 5000～1000 個の *M. tuberculosis* 菌体があるとする事を考えると、本研究の方法により塗抹陽性検体の多くが検出されるものと考えられる。また、この感度はこれまでに報告のある PCR、LAMP その他の遺伝子増幅法と同等あるいはそれ以上であった。

図 3 に予想される増幅の様式を図示した。Direct repeat 上に外向きに結合したプライマーを起点として増幅された産物は、自分よりも上流の遺伝子増幅産物をはがしながら伸長を続ける。結果として 1 本鎖遺伝子増幅産物が生成し、これがもう一方のプライマーの標的となる。こちらの鎖においても同様な合成反応が起こり、次々と 1 本鎖遺伝子増幅産物が生成する。生成した 1 本鎖遺伝子増幅産物は再び反対側のプライマーからの合成の鋳型となるといった反応が繰り返される。これに加えて生成した 1 本鎖遺伝子増幅産物どうしがお互いを鋳型として伸長反応を引き起こし、より長い遺伝子増幅産物が形成されるものと考えられる。

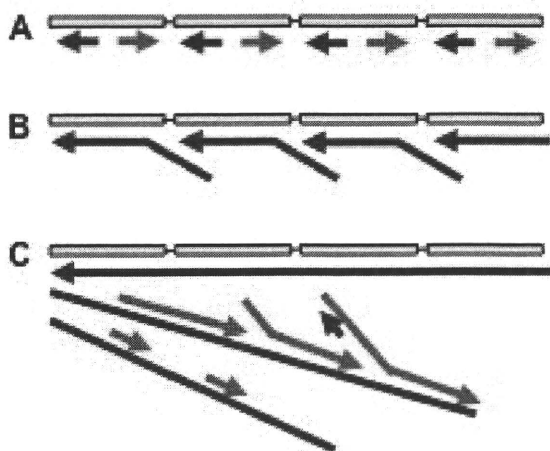


図 2 新規等温遺伝子増幅法における増幅様式

リピート配列上に上流向き、下流向きに設けられた 2 種類のプライマー (図 : A) が各リピート単位に結合し、その各々が増幅を開始するが、DNA 合成酵素として鎖置換作用を持つ *Bst* polymerase を用いるため前方の鎖が一本鎖となり (図 : B)、新たにプライマーが結合して増幅が進行する (図 : C)

## E. 結論

本研究で開発した等温増幅法は感度および特異性に優れたものであり、その簡便性から臨床応用も容易なものと考えられる。今後、臨床検体を用いた評価を通じてその有用性を検証してゆく必要があるものと考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsuoka, M., Y. Suzuki, I. E. Garcia, M. Fafutis-Morris, A. Vargas-González, C. Carreño-Martinez, Y. Fukushima, and C. Nakajima. 2010. Possible mode of emerging drug resistant leprosy cases revealed in Mexican samples' analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 412-416.
- 2) Fukasawa, T., N. Oda, Y. Wada, A. Tamaru, Y. Fukushima, C. Nakajima, and Y. Suzuki. 2010. A novel method for the purification of DNA by capturing nucleic acid and magnesium complexes on non-woven fabric filters under alkaline conditions for the gene diagnosis of tuberculosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 246-250.
- 3) Nakajima, C., Z. Rahim, Y. Fukushima, I. Sugawara, A. G. M. van der Zanden, A. Tamaru, and Y. Suzuk. 2010. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Bangladesh by a Species Distinguishable Multiplex PCR. *BMC Infect. Dis.*, 10: 118.

### 2. 学会発表

- 1) 金玄、中島千絵、鈴木定彦. 結核菌のニューキノロン高度耐性獲得機構. 第 83 回日本ハンセン病学会総会. 2010 年 5 月 鹿児島
- 2) Nakajima, C., B. H. Mudenda, Z. Rahim, Y. Fukushima, H. Suzuki and Y. Suzuki.

Surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) infection in animals. Asian-African Research Forum for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. 2010年11月 ベトナム, ハノイ

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)

自然免疫系による結核感染防御機構の解析

分担研究報告書

研究分担者

竹田 潔

(大阪大学・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

自然免疫系による結核感染防御機構に関する研究

研究分担者 竹田 潔 （大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授）

研究要旨.

非病原性結核菌 *M. bovis* BCG で欠損する ESAT-6, CFP-10 のマクロファージの機能におよぼす影響を解析した。CFP-10 を恒常的に発現したマクロファージでは、BCG 感染に対する感受性が高くなった。このことから、CFP-10 は病原性因子として作用することが確認された。さらに ESAT-6, CFP-10 に会合する宿主分子を、プロテオミクス法のアプローチにより同定した。従来 ESAT-6 に会合することが報告されている分子に加え、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。今後、これら分子が ESAT-6, CFP-10 と会合した結果、貪食胞の成熟にどのような影響を及ぼすかを解析していきたい。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR) ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLR を介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、自然免疫系の活性化を利用した新規治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞の成熟を抑制し増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT-6, CFP-10 が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる *M. bovis* BCG 株で欠損していることが知られている。ESAT-6 は、T 細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、一方で CFP-10 と複合体を形

成し、貪食胞の中で結核菌から分泌されることも知られている。また、CFP-10 は貪食胞の成熟を抑制することを示唆する報告もある。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT-6, CFP-10 が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。ESAT-6 および CFP-10 の哺乳類用の発現ベクターを作製し、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に導入し、両遺伝子の恒常発現細胞株を単離しようとした。CFP-10 恒常発現マクロファージに、非病原性の BCG を感染させ、2, 3 日後に菌数を測定した。CFP-10 発現細胞を用い、Flag, Myc タグなどを用いた免疫沈降法により、CFP-10 に会合する宿主分子の同定を試みた。ESAT-6 については、恒常発現細胞株が単離できないので、GST 融合 ESAT-6 を一過性に発現させ、その細胞溶解液を GST pull down を行うことにより、ESAT-6 に会合する宿主分子の同定を試みた。

倫理面への配慮 本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験

に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

### C. 研究結果

マクロファージ細胞株 RAW264.7 に ESAT-6, CFP-10 遺伝子を導入したが、CFP-10 恒常発現株は単離できたが、ESAT-6 恒常発現株は単離することができなかった。CFP-10 恒常発現マクロファージをもちいて、この細胞に非病原性の BCG を感染させたところ、CFP-10 恒常発現細胞で、有意に BCG の菌数が増加した。CFP-10 の哺乳類細胞発現ベクターには、Flag, Myc タグおよび TEV プロテアーゼ切断部位が挿入されているので、CFP-10 恒常発現マクロファージ細胞株から、細胞溶解液を作製し、これを抗 Flag, Myc 抗体および TEV プロテアーゼで処理し、これらの処理により抽出されたタンパク溶解液を電気泳動し、抽出されたタンパク質を解析したところ、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。また GST 融合 ESAT-6 タンパク質を用いた pull down 解析でも、ESAT-6 に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来 ESAT-6 に会合することが報告されている、TLR2, MHC class I 分子が同定されるとともに、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。

### D. 考察

ESAT-6 は何度試みても、恒常発現マクロファージ株を単離することができなかった。ESAT-6 はマクロファージに細胞死を誘導するのかもしれない。

CFP-10 を恒常的に発現させたマクロファージの解析から、CFP-10 がマクロファージにおいて病原性を担っていることが示唆された。

ESAT-6, CFP-10 に会合する分子として、貪食胞に関連する分子をいくつか同定した。これら分子の中に、ESAT-6/CFP-10 が相互作用し、その機能を抑制するなどして貪食胞の成熟を抑制するものが存在しているものと考えている。今後、これら分子候補の中で、ESAT-6/CFP-10 が実際に会合する分子を同定し、さらにどのような分子機構で

貪食胞の成熟が抑制されているのかを明らかにしていきたい。

### E. 結論

結核菌由来の遺伝子 CFP-10 を、宿主マクロファージに直接発現させることにより、このマクロファージが非病原性の BCG に対する感受性が高まることを見出した。異なるプロテオミクス法を用いたアプローチにより、ESAT-6, CFP-10 に会合する宿主分子候補を同定した。今後、これら候補分子の ESAT-6, CFP-10 会合による貪食胞成熟に及ぼす影響を明らかにしていきたい。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) Takeda, K. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. 31 May - 3 June, 2010, Greifswald, Germany
  - 2) Takeda, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, 12-13 July, 2010, Osaka, Japan
  - 3) Takeda, K., and H. Kayama. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe, Japan
  - 3) 竹田潔. 自然免疫系の活性制御と腸管炎症. 第 22 回微生物シンポジウム (特別講演)、2010 年 9 月 3-4 日、大阪
  - 4) Takeda, K. Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity



Society, 7-9. October, 2010,  
Vancouver, Canada

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)

抗酸菌感染症と神経障害

分担研究報告書

研究分担者

後藤 正道

(国立療養所星塚敬愛園・園長)

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

抗酸菌感染症と神経障害

研究分担者 後藤 正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）

研究協力者 圓 純一郎（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・客員研究員）

研究要旨.

ヒト難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍(抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* 感染症)は無痛性が特徴であるが、無痛性の原因に対する組織・細胞学的研究は少ない。そこで(1) Mycolactone A/B 投与を行った線維芽細胞とマクロファージの細胞学的検討ならびに(2)アポトーシスを引き起こす Mycolactone の至適濃度の検討を行った。

A. 研究目的

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*)感染によってひき起こされるヒトの難治性皮膚疾患であり、熱帯、亜熱帯地域で見られる。大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成され、重篤な身体後遺症を残すことが多いことからハンセン病と同様に社会的な偏見を受けやすく、治療法の確立が望まれている。WHOは、結核、ハンセン病に次ぐ重要な抗酸菌感染症としてブルーリ潰瘍の対策を行っており、医学的な研究、公衆衛生及び社会的支援を世界中の協力で進めている。

病態の解明と治療法の確立が望まれているが、ブルーリ潰瘍では巨大な潰瘍にもかかわらずほとんど痛みがない理由は全くわかっていなかった。我々はハンセン病の神経障害について研究してきたが、その経験を元にブルーリ潰瘍の病変を検索し、らい菌以外の抗酸菌症でも末梢神経病変が起きることを見出した。また *M. ulcerans* は毒性脂質 Mycolactone を産生するが、マウスへの Mycolactone 投与においてブルーリ潰瘍と同様の末梢神経障害が起きることを見出した。本研究ではこれらの研究を進展させ、ブルーリ潰瘍における無痛性病変成立のメカニズムを解明するとともに、治療を目指した研究基盤の確立を目的とする。

菌から分離・精製した Mycolactone は線維芽細胞とマクロファージにアポトーシス

を誘導することが知られているが、今年度は人工合成した Mycolactone を用いて実験を行い、アポトーシス誘導性の確認と、Mycolactone の至適濃度の検討を行った。

B. 研究方法

1) 培養線維芽細胞への Mycolactone 投与

L929 mouse fibroblast cells(ATCC CCL1)を、10% horse serum を含む Eagle's Minimum Essential Medium を用いて、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37.0°Cにて細胞培養を行った。実験には5回継代した細胞を使用した。

合成した Mycolactone A/B を 100%エタノール(ETOH)で 1mg/ml に希釈し(ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与)、さらに PBS で段階希釈した。線維芽細胞 2x10<sup>4</sup> を 24 穴プレートで 24h 培養し、その培地 0.45ml に PBS 段階希釈 Mycolactone A/B の 0.05ml を入れ、それぞれ 30ul/ml、3ug/ml、300ng/ml、30ng/ml、3ng/ml、300pg/ml の最終濃度になるようにした。

対照として 100%ETOH を同様に PBS で希釈し、培養線維芽細胞に加えた。

2) マクロファージへの Mycolactone 投与

J774A.1 mouse macrophage cells(ATCC TIB 67)を、10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用いて、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37.0°Cにて細胞培養を行った。実験には5回継代した細胞を使用

した。

1)と同様に合成 Mycolactone A/B を PBS で希釈し、マクロファージ  $2 \times 10^4$  を 24 穴プレートで 24h 培養し、それぞれ 30ul/ml、3ug/ml、300ng/ml、30ng/ml、3ng/ml、300pg/ml の最終濃度になるようにした。

対照として 100% ETOH を同様に PBS で希釈し、培養マクロファージに加えた。

#### 倫理面への配慮

本研究では、実験株として既に安全性が確立された細胞株を使用し、感染性を有する実験材料は使用していない。また、廃棄物処理や実験場所に関して、関係法令・指針および研究施設の設けた基準を遵守して行った。

#### C. 研究結果

##### 1) 培養線維芽細胞への Mycolactone 投与

実験開始 24 時間後には Mycolactone A/B 濃度 30ug/ml、3ug/ml、300ng/ml では細胞が培地上に多数浮遊してきており、細胞死が確認された。30ng/ml では、細胞が培地上に浮遊しているものの上記 3 濃度に比較すると数は少なかった。3ng/ml、300pg/ml では浮遊細胞はほとんど確認されなかった。

60 時間後には 30ng/ml においては、浮遊細胞が増加したが、3ng/ml、300pg/ml においてはほとんど浮遊細胞が確認されなかった (図 1b, 1c)。

対照の ETOH に関しては、24 時間、60 時間ともに全ての濃度において浮遊細胞数はわずかであり、細胞死は確認されなかった (図 1a)。

##### 2) マクロファージへの Mycolactone 投与

線維芽細胞と同様に実験開始 24 時間後には Mycolactone A/B 濃度 30ug/ml、3ug/ml、300ng/ml においては細胞が培地上に多数浮遊し、細胞死が確認された。30ng/ml においては、細胞が培地上に浮遊しているものの上記 3 濃度に比較すると数は少なかった。3ng/ml、300pg/ml においてはほとんど浮遊細胞が確認されなかった。

60 時間後には 30ng/ml においては、浮遊

細胞が増加したが、3ng/ml、300pg/ml においてはほとんど浮遊細胞が確認されなかった。

対照の ETOH に関しては、24 時間、60 時間ともに全ての濃度において浮遊細胞数はわずかであり、細胞の死亡は確認されなかった。

#### D. 考察

我々はマウスへの Mycolactone 投与で末梢神経障害が起きることを見出しているが、Mycolactone が培養シュワン細胞等の神経系細胞に与える影響を解析することによってその機序を解明しようとしている。

George KM ら (2000) は、L929 線維芽細胞へ Mycolactone 3ng/mg から 3mg/ml を投与し、投与後 3 日目で広範囲の細胞死を認めている。しかし、*M. ulcerans* は Mycolactone 以外の毒性物質も産生しているとする考えもあり、菌から精製した Mycolactone にはそれらの毒性物質が混入する可能性も否定出来ない。

そこで、今回は人工合成した Mycolactone A/B の供与を受け、線維芽細胞とマクロファージへの合成 Mycolactone の細胞毒性を検討した。3 日間の培養後に評価を予定していたが、24h の時点ですでに明瞭な細胞死が観察され、合成 Mycolactone の生物活性が証明できた。精製 Mycolactone と比較して、細胞障害を引き起こす最小濃度はやや高い傾向が観察され、培養 24 時間後の線維芽細胞とマクロファージでは 30-300ng/ml であり、培養 60 時間後の線維芽細胞とマクロファージでは 3-30ng/ml であった。

現在、電気泳動による DNA ladder の確認と、TUNEL 法 (CHEMICON ApopTag キット) を用いて、これらの細胞におけるアポトーシスの有無を解析中である。

来年度は、合成 Mycolactone A/B を培養シュワン細胞に投与し、シュワン細胞の動態についての解析を行う予定である。

#### E. 結論

培養線維芽細胞とマクロファージを用い