

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

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

研究分担者 田村 敏生 （国立感染症研究所・感染制御部・室長）

研究要旨.

本研究は、Th1 免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリー CD8⁺細胞障害性 T 細胞を誘導する活性を有するペプチドを結核菌分泌タンパクより検索し、その誘導機序を明らかにすることで抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを最終目的としている。

昨年度までに結核菌分泌タンパク Ag85B 由来のペプチド：Peptide-25 が①選択的かつ強力に Th1 分化を誘導できること、②Peptide-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) 及び既知のサイトカイン産生や副刺激分子の発現が認められない Chinese Hamster Ovary 細胞に I-A^b 遺伝子を導入した細胞 (I-A^b-CHO) を抗原提示細胞として用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③この分化には Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本年度は IL-12R β2 鎖の発現誘導における Peptide-25 を介した TCR シグナル及び TAF7 の役割を検討した。その結果、①Peptide-25 刺激によって T-bet 非依存的、IL-12 を含むサイトカイン非依存的に IL-12 受容体 (R) β2 鎖の発現が誘導されること、②Peptide-25 刺激による IL-12R β2 鎖の発現誘導に STAT4、ERK1/2 が関与していること、③TAF7 の強制発現は IL-12R β2 鎖の発現を誘導または増強できないことが明らかとなり、結核菌の分泌タンパクが既知の Th1 分化誘導機構とは異なる経路で Th1 分化を誘導する機構を活性化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核ワクチンの目的は主に結核菌特異的獲得免疫を惹起し、長期生存型メモリー CD8⁺細胞障害性 T 細胞 (CTL) を効果的に誘導することである。この長期生存型メモリー CTL の誘導には IFN-γ、TNF-α を産生する CD4⁺ Th1 細胞の存在が不可欠である。したがって、より効果的な結核ワクチンを開発するためにはナイーブ CD4⁺ T 細胞から Th1 細胞への分化誘導機構を正確に理解する必要がある。

本研究は、Th1 免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリー CTL を誘

導する活性を有するペプチドを結核菌分泌タンパクより検索し、その誘導機序を明らかにすることで抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

私のこれまでの解析から、①結核菌分泌タンパク Ag85B のヘルパーエピトープを検索し、15 個のアミノ酸からなる Peptide-25 (FQDAYNAAGGHNAVF) が、I-A^b 拘束性に選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できること、②Peptide-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) 及び既知のサイトカイン産生や副刺激分子の発現が認められない Chinese

Hamster Ovary 細胞に I-A^b 遺伝子を導入した細胞 (I-A^b-CHO) を抗原提示細胞として用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③DNA マイクロアレイ法を用いた解析から Peptide-25 刺激によって誘導される T-bet 非依存性の Th1 分化には TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにし、結核菌は自身が分泌するタンパクを介し積極的に Th1 分化を誘導することを示してきた。

Th1 細胞への分化には IFN- γ で誘導される T-bet よりも IL-12 によって活性化される STAT4 が重要であることが最近報告された。しかし、ナイーブ CD4⁺ T 細胞には機能的 IL-12 受容体 (R) の構成分子である IL-12R β 2 鎖が発現していない。この 2 つの知見は抗原刺激を受けたナイーブ CD4⁺ T 細胞には IFN- γ 、IL-12 非依存的に IL-12R β 2 鎖の発現を誘導する機構が存在する可能性を示唆している。

本年度は IL-12R β 2 鎖の発現誘導における Peptide-25 を介した TCR シグナル及び TAF7 の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) Peptide-25 を介した TCR 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導の検討

T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、PE 標識抗 IL-12R β 2 抗体を用いて染色し、CD4⁺ T 細胞上の IL-12R β 2 鎖の発現を FACSCanto を用いて評価した。また、Peptide-25 で刺激する際に抗 IFN- γ 中和抗体及び抗 IL-12 中和抗体を添加し、これらサイトカインの影響を完全に排除した。

(2) Peptide-25 を介した TCR 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導における TAF7 の役割の検討

I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激した

T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ 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、レンチウイルス発現ベクター CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus (理化学研究所 三好 浩之博士及び宮脇 敦史博士より供与) に組み込んだ。常法に従い、レンチウイルス液を調製し、レトロネクチンを用いてレンチウイルス結合プレート (48 穴培養プレート) を作成した。そのプレートに T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を添加し、72 時間培養することでナイーブ CD4⁺ T 細胞にレンチウイルスを感染させた。

レンチウイルス感染 T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-12 抗体存在下に Suboptimal 用量の抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、経時的に CD4⁺ T 細胞を回収し、PE 標識抗 IL-12R β 2 抗体で染色し、Venus 陽性細胞の IL-12R β 2 鎖の発現を FACSCanto を用いて評価した。

(3) Peptide-25 を介した TCR 刺激による STAT4 の活性化の検討

IL-12 刺激によって STAT4 は 693 番目のチロシン残基と 721 番目のセリン残基のリン酸化が誘導され、その結果 IL-12R β 2 鎖の発現を増強することが報告されている。

STAT4 のチロシン残基のリン酸化は、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、PE 標識抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体で染色し、FACSCanto を用いて評価した。

STAT4 のセリン残基のリン酸化は Peptide-25 で刺激する際に STAT4 セリン残基のリン酸化の責任酵素であることが報告されている MAP キナーゼの阻害剤 (ERK1/2 阻害剤:U0126、p38MAPK 阻害剤:SB203580 及び JNK 阻害剤:SP60015) を添加し、IL-12R β 2 鎖の発現に対する影響を指標に評価した。

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) Peptide-25 を介した TCR 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導の検討

T-bet 遺伝子を強制発現させた CD4⁺ T 細胞における解析から T-bet には *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリング誘導能及び IL-12R β 2 鎖発現誘導能を有していることが報告された。一方で、STAT4 欠損及び T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞を用いた解析から T-bet はナイーブ CD4⁺ T 細胞内に既に発現している Th2 分化を促進する転写因子 GATA3 の発現を抑制することが主たる機能であって、*ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリング誘導及び IL-12R β 2 鎖発現誘導は STAT4 によって担われていることが最近報告された。しかし、ナイーブ CD4⁺ T 細胞には機能的 IL-12R の構成分子である IL-12R β 2 鎖は発現していない。また、Th1 細胞への分化過程では IL-12-IL-12R 相互作用のみが STAT4 の活性化を誘導すると考えられている。したがって STAT4 が *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリング誘導及び IL-12R β 2 鎖発現誘導の責任因子であるとするれば、ナイーブ CD4⁺ T 細胞が抗原を認識した直後に何らかの機構によって IL-12R β 2 鎖の発現が誘導されなければならない。

そこで、Peptide-25 を介した TCR 刺激が IL-12R β 2 鎖の発現を誘導する可能性を検討した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、IL-12R β 2 鎖の発現を検討した結果、刺激 40 時間後になって IL-12R β 2 鎖の発現がサイトカイン (IL-12、IFN- γ) 非依存性に誘導された。この発現の程度は野生型の P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 刺激した場合とほぼ同程度であった。

(2) Peptide-25 を介した TCR 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導における TAF7 の役割の検討

私はレトロウイルスを用い T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞に TAF7 遺伝子の強制発現させた解析から、TAF7 は

T-bet と同様に *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを誘導する活性を有していることを明らかにしている。また、強制発現系を用いた解析から T-bet は IL-12R β 2 鎖の発現誘導能を有していることが報告されている。そこで、TAF7 の IL-12R β 2 鎖の発現誘導能を検討した。IL-12R β 2 鎖の発現は T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞が増殖し始める Peptide-25 刺激 40 時間後に誘導されるため、IL-12R β 2 鎖の発現誘導における TAF7 の役割を解析するためには非増殖性の細胞に遺伝子導入できる強制発現系を用いなければならない。レトロウイルスを用いた強制発現系は分裂増殖している細胞への導入は可能であるが、非増殖性細胞へはほとんど導入することはできない。そこで、非増殖性の細胞へも遺伝子導入が可能なレンチウイルスを用いて解析を行った。レトロネクチンを固相化したプレートにウイルスを結合させることで、ウイルス液中に含まれる夾雑物を排除し、ウイルス液中の毒性を軽減させた状態で T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を 3 日間培養した結果、8%程度の細胞に TAF7 遺伝子を導入することができた。そのレンチウイルス感染細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-12 抗体存在下に Suboptimal 用量の抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、Venus 陽性細胞の IL-12R β 2 鎖の発現を検討した。その結果、TAF7 を導入しても IL-12R β 2 鎖の発現誘導及び増強効果は全く見られなかった。

(3) Peptide-25 を介した TCR 刺激による STAT4 の活性化の検討

IL-12-IL-12R 相互作用によって Jak2 及び Tyk2 の活性化が誘導され、その結果 STAT4 の 693 番目のチロシン残基がリン酸化される。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体を用いて STAT4 のチロシンリン酸化を検討した。その結果、刺激 12 時間後に STAT4 のチロシンリン酸化が誘導され始め、刺激 48

時間後まで持続的にリン酸化されていた。IL-12 以外に IL-23, IL-27, IFN- α が STAT4 のチロシンリン酸化を誘導出来ることが報告されている。そこで、Peptide-25 刺激後の T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞におけるこれらサイトカインの mRNA の発現を PCR 法にて検討したが、発現は認められなかった。

IL-12-IL-12R 相互作用によって p38MAP キナーゼの活性化が誘導され STAT4 の 721 番目のセリン残基がリン酸化される。そこで、I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を刺激する際に MAP キナーゼの阻害剤を添加し、刺激 40 時間後の IL-12R β 2 鎖の発現誘導に対する影響を検討した。その結果、p38MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 (10 μ M) 及び JNK 阻害剤 SP60015 (2.5 μ M) を添加しても IL-12R β 2 鎖の発現は全く影響を受けなかったが、ERK1/2 の阻害剤 U0126 (10 μ M) を添加すると IL-12R β 2 鎖の発現が完全に抑制された。

D. 考察

STAT4 欠損及び T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞を用いた解析から Th1 分化に必須の *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングには T-bet よりも STAT4 の活性化が重要であることが報告された。一般的には STAT4 の活性化は IL-12-IL-12R 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⁺ T 細胞は IL-12R β 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。そこで、TCR からの活性化シグナルが IL-12R β 2 鎖の発現を誘導している可能性を考え検討を行った。その結果、Peptide-25 刺激 40 時間後に野生型及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞上に IL-12R β 2 鎖の発現が認められた。このことから TCR からの活性化シグナルによって T-bet 非依存的に IL-12R β 2 鎖の発現が誘導されることが明らかになった。そこで、T-bet と同様に *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリング誘導能を有する TAF7 の IL-12R β 2 鎖の発現誘導能

を検討した。遺伝子導入方法として非増殖性の細胞に遺伝子導入が可能であることが報告されているレンチウイルスを用いた。その結果、TAF7 遺伝子が導入された細胞において suboptimal 用量の TCR 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導及び発現増強は全く見られなかった。このことから Peptide-25 刺激で誘導される TAF7 は IL-12R β 2 鎖の発現誘導を有していないことが示唆された。レンチウイルスを用いた遺伝子導入法は既にヒト由来 CD4⁺ T 細胞に対し、80%以上の効率で遺伝子導入が可能であることが報告されているが、私の実験系では 1/10 の 8%程度の導入効率しか得られていない。この原因は①種差によるもの、②導入方法の些細な差によるものなどが考えられ、さらに解析する必要があると思われる。また、ナイーブ CD4⁺ T 細胞に TAF7 遺伝子を導入するために 3 日間培養した。この培養期間で TAF7 蛋白の発現が機能を発揮するに充分かを確認する必要があると思われる。

IL-12R β 2 鎖の発現誘導機構における TAF7 の関与が否定されたため、IL-12R β 2 鎖発現誘導能を有している STAT4 の関与に関して検討した。まず、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞において STAT4 が既に発現していることを確認した。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 刺激し、STAT4 のチロシンリン酸化を FACS 法にて検討した。その結果、Peptide-25 刺激 12 時間後から STAT4 のチロシンリン酸化が誘導され始め、48 時間後までそのリン酸化は持続した。一般的に STAT4 のチロシンリン酸化はサイトカイン受容体を介して活性化する JAK が担っていると考えられている。そこで、STAT4 のチロシンリン酸化を誘導することが報告されている IL-23, IL-27, IFN- α が T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞によって産生されるか PCR 法にて検討したが、いずれのサイトカインも mRNA 発現は誘導されていなかった。したがって、Peptide-25 を介した TCR 刺激による STAT4 のチロシンリン酸化はサイトカイン非依存性誘導され

ている可能性が示唆された。TCR 活性化シグナル伝達機構で中心的な役割を担っている Lck が STAT4 を基質にできる可能性が示されている。このことは STAT4 のチロシンリン酸化が JAK ではないチロシンキナーゼによって担われる可能性を示している。今後、STAT4 のチロシンリン酸化における Lck、ZAP70 などのチロシンキナーゼの関与を検討する必要がある。IL-12-IL-12R 相互作用による STAT4 のセリンリン酸化は p38MAP キナーゼに担われていることが報告されている。そこで、Peptide-25 刺激で誘導される IL-12R β 2 鎖の発現における MAP キナーゼの関与を検討した。その結果、p38MAP キナーゼではなく、ERK1/2 が IL-12R β 2 鎖の発現誘導に関与している可能性が示唆された。今後 ERK1/2 と STAT4 の関わり合い及び STAT4 のセリンリン酸化と IL-12R β 2 鎖の発現誘導の関わり合いに関してさらに詳細に検討する必要がある。

E. 結論

Peptide-25 を介した TCR 刺激によって誘導される IL-12R β 2 鎖の発現は T-bet 及び TAF7 非依存的、サイトカイン非依存的な STAT4 の活性化によって調節されていることが示唆され、結核菌の分泌タンパクが既知の Th1 分化誘導機構とは異なる経路で Th1 分化を誘導する機構を活性化する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M.D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 2010. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4⁺ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *Int. Immunol.*, 22: 307-318.

- 2) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant BCG producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 185: 6234-6243.

2. 学会発表

- 1) 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. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 2) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M.D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4⁺ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. 14th International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.
- 3) 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
- 4) 田村敏生. 結核分泌蛋白由来ペプチドによる Th1 型免疫応答誘導機序の解析. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都

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)

結核疫学解析、結核の臨床研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 智成

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・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

結核疫学解析、結核の臨床研究

研究分担者 松本 智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・
臨床研究部・部長）

研究要旨.

リファンピシン(RFP)は結核治療において重要な薬剤であり、非結核性抗酸菌症(NTM)、特に *Mycobacterium avium and intracellulare* (MAC) に対しても使用される。MAC の加療においてはクラリスロマイシン(CAM)が主要な薬剤であり、その薬剤感受性が加療に大きく影響すると言われているが、RFP、リファブチン(RFB)の治療に対する薬剤感受性の効果は不明な点が多い。今回、MAC 症に対する治療目的の為に使用される RFP と RFB の MIC、*rpo β* の hotspot の遺伝子変異を測定し、結核菌のそれと比較した。RFP 耐性の *M. tuberculosis* に対して RFB 感受性があるので RFB が使用される場合がある。特に、今回の我々の検討では *rpo β* に D516V 遺伝子変異がある場合、Agar proportion method にて薬剤感受性を求めた場合、RFP に対しては薬剤耐性株であるが、RBT に対しては感受性株であった。しかしながらこのような場合に RFB を使用しても、MIC 値が高いので薬剤感受性試験では感受性と判定されても臨床効果が期待できない可能性が高いことがわかった。また、MAC に対して RFP の代わりに RFB を使用した場合、MIC の低下が認められ、一部、MIC 0.03 以下の MAC 菌の存在が認められる。このような菌に対して RFB を使用すると治療効果が得られる可能性が高いと思われる。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌症(NTM)、特に *Mycobacterium avium and intracellulare* (MAC) は、治療抵抗性である。MAC の加療は、リファンピシン(RFP)、エタンブトール(EB)、クラリスロマイシン(CAM)が使われる。さらに、日本ではリファブチン(RFB)の使用が可能になった。MAC の加療においては、CAM が主要な薬剤であり、その薬剤感受性が治療効果に大きく影響すると言われているが、RFP、RFB の MAC 治療に対する薬剤感受性の効果は不明な点が多い。今回、MAC 症に対する治療目的の為に使用される RFP と RFB の MIC、*rpo β* の hotspot の遺伝子変異を測定し、結核菌のそれと比較した。

B. 研究方法

Mycobacterium tuberculosis 90 株、*Mycobacterium avium* 100 株、*Mycobacterium*

intracellulare 50 株の RFP、RFB に対する感受性を proportion method、MIC 値測定(0.0005-32)により行った。また、これら MIC 値を測定した株に対して *rpo β* の hotspot のシークエンスを行い RFP の MIC 値、RFB の MIC 値および変異部位と変異様式間の比較を行った。

C. 研究結果

#1. Rifampicin と rifabutin に対する MAC の MIC

RFP においては、*Mycobacterium avium* は、MIC 値 1 を最大数として分布し、一方、*Mycobacterium intracellulare* は、MIC 値 0.12 を最大数として一峰性分布した。RFB においては、*Mycobacterium avium* は、MIC 値 0.06 を最大数として一峰性分布し、同様に、*Mycobacterium intracellulare* においても、MIC 値 0.06 を最大数として一峰性分

布した。*M. avium* ATCC 25291 および *M. intracellulare* ATCC 13950 の遺伝子配列を比較するとすべての菌株において *rpoβ* hotspot に変異が認められた。

#2. Rifampicin と rifabutin に対する *M. tuberculosis* の MIC

Rifampicin: 最大構成数を有する MIC 値は 0.008 であった。また、Rifampicin の MIC が 0.03 未満の結核菌株においては、*rpoβ* 領域の遺伝子変異は認められなかった。また、遺伝子変異がある株において主要な、*rpoβ* 領域の遺伝子変異は、S531L、H526Y、H526R、D516V であった。

Rifabutin: 最大構成数を有する MIC 値は 0.002 であった。Rifampicin において MIC 値>1 の結核菌株が RFB にて、RFP よりも MIC 値の低下が認められるがすべて MIC > 0.05 であった。*rpoβ* に他に遺伝子変異があっても、D516V 遺伝子変異がある場合、Agar proportion method にて薬剤感受性を求めた場合、RFP に対しては薬剤耐性株であるが、RBT に対しては感受性株であった。

D. 考察

今回の我々の研究結果より、*M. tuberculosis* に対して RFP の MIC は、0.03 よりもさらに低い MIC 濃度を示す事がわかった。*M. tuberculosis* に対して RFP の MIC 分布を考慮すると RFP の感受性域は現在の 0.06 から、さらに低く設定されるべきかもしれない。同じ、*M. tuberculosis* において RFB は RFP よりも低い MIC を示す傾向にあり、現在の薬剤判定基準では、RFP では R から RFB では、I, S になる株もある。しかしながらほとんどが RFB に対して MIC が 0.03 より上であり臨床効果があるかは不明である。

今回の我々の検討では、D516V に遺伝子変異がある場合、Agar proportion method にて薬剤感受性を求めた場合、RFP に対しては薬剤耐性株であるが、RBT に対しては感受性株であった。したがって D516V 変異があれば、RFP 耐性結核菌株で RFB が感受性なので、RFB が使用できる可能性がある

が、このような菌株に対して RFB を使用しても MIC が高く臨床効果が期待できない可能性が高い。MAC に対して RFP の代わりに RFB を使用した場合、MIC の低下が認められ、一部、MIC 0.03 以下の MAC 菌も認められる。このような菌に対して RFB を使用すると治療効果が得られる可能性が高いと思われる。

E. 結論

今回の我々の検討では RFP 耐性の *M. tuberculosis* において、*rpoβ* に D516V 遺伝子変異がある場合、他に遺伝子変異が存在しても Agar proportion method では、RFP に対しては薬剤耐性株であるが、RBT に対しては感受性株であることが明らかとなった。しかしながらこのような場合に RFB を使用しても、MIC 値が高いので薬剤感受性試験では感受性と判定されても臨床効果が期待できない可能性が高いことがわかった。また、MAC に対して RFP の代わりに RFB を使用した場合、MIC の低下が認められ、一部、MIC 0.03 以下の MAC 菌の存在が認められる。このような菌に対して RFB を使用するとより高い治療効果が得られる可能性が高いと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abadia, E., U. Zhang, T. Dos Vultos, V. Ritacco, K. Kremer, E. Aktas, T. Matsumoto, G. Refregier, D. Van Soolingen, B. Gicquel, and C. Sola. 2010, Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect. Genet. Evol.*, 1066-1074.

2. 学会発表

- 1) 松本智成. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 大都市結核対策研究会 2010年3月 大阪
- 2) 松本智成. Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular

- Epidemiology of Tuberculosis. 第83回日本細菌学会総会ワークショップ W6 新興・再興感染症の疫学情報からみた課題と問題点 2010年3月 東京
- 3) 松本智成. 生物製剤使用の為の結核対策. リウマチ医の為の肺障害研究会 2010年3月 東京
 - 4) 松本智成. Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular Epidemiology of Tuberculosis. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 東京
 - 5) 松本智成. 「感染症とサイトカイン」. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
 - 6) 松本智成. 自動細菌タイピング装置、D i v e r s i L a bによる結核菌株の解析. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
 - 7) 松本智成. 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗 TNF 製剤投与の安全性と有効性. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 兵庫
 - 8) 松本智成. Safety of Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Eight Patients with Tuberculosis. 第50回日本呼吸器学会総会 2010年4月 京都
 - 9) 松本智成. トルコの結核菌株および大阪結核菌株間の DNA 代謝遺伝子相同性の新規 SNPs での解析-3:-VNTR 解析による T3-Osaka 株と2007年に大阪と東京で得られた結核菌株間の比較 財団法人大阪結核研究会奨学研究費対象研究. 大阪結核研究会 2010年5月 大阪
 - 10) 松本智成, 阿野裕美, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 坂谷光則, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 第80回実験結核研究会 2010年5月 京都
 - 11) 松本智成. 細菌学4 (結核菌・抗酸菌・真菌等). 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
 - 12) 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 当センターで得られた Mycobacterium tuberculosis 株における rifampin と rifabutin の minimum inhibitory concentration の検討. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
 - 13) 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 当センターで得られた Mycobacterium avium 株および Mycobacterium intracellulare 株における rifampin と rifabutin の minimum inhibitory concentration の検討: 結核菌株と比較してアビウムの加療時の rifampin の MIC による感受性試験結果は現実とあっていない可能性が高い. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
 - 14) 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗 TNF 製剤投与. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
 - 15) 松本智成, 阿野裕美, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 坂谷光則, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅. 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌の VNTR 解析. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
 - 16) 松本智成. 生物学的製剤使用時における結核のスクリーニング、予防内服、治療について. 日本内科学会東北地方会 第56回生涯教育後援会 2010年6月 仙台
 - 17) Matsumoto, T. Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Patients with Tuberculosis. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.

18) 松本智成. 多剤耐性結核の分子疫学解析とゲノム解析の今後展望. 第 63 回
日本細菌学会九州支部総会 2010 年 9
月 宮崎

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)

結核病態に関する分子生物学的研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 壮吉

(大阪市立大学・准教授)

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

結核病態に関する分子生物学的研究

研究分担者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授）

研究要旨.

リポアラビノマンナンやリポマンナンの適切な合成に、MSMEG-4247 (Rv2181) が関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

抗酸菌は、細胞壁に特徴的な糖脂質を有し、それが宿主応答を介して、菌の生体内生存戦略と関わっている。リポアラビノマンナン (LAM) やリポマンナン (LM) は、抗酸菌細胞壁の主要糖脂質であるが、それぞれファゴゾーム-ライソゾーム融合の阻止やDC-SIGNを介したインターロイキン10の産生誘導による免疫抑制、また Toll-like receptor を介した免疫賦活などの作用が報告されており、抗酸菌感染症の病態と密接な関係があると考えられる。特に LAM は、高病原性と低病原性の抗酸菌、例えば *Mycobacterium tuberculosis* と *Mycobacterium smegmatis* では、LAM の末端にマンノースキャップの有無に違いがあり、免疫原性が異なることが知られている。このように LAM や LM は、抗酸菌感染症を理解する上で重要であるが、その生合成経路については、未だ完全には解明されていない。

LM や LAM は、フォスファチジルイノシトールマンノシド (PIM) と同じ脂質骨格を持つことから、順次、同じ合成系で合成されると考えられる。PIM はフォスファチジルイノシトール (PI) に、PimA と PimB という酵素によって、GDP-マンノース依存的に最初の二つのマンノースが付加される。次に、アシルトランシフェラーゼによって脂肪酸が転移され (AcPIM2)、さらに4つのマンノースが付加されて AcPIM6 が作られる。この転移反応を触媒する酵素で、これまで同定されているのは5番目にマンノースを付加する PimE である。一方、AcPIM4

は、LM や LAM の合成における分岐点と考えられている。なぜなら AcPIM6 は alpha1,2-結合であるのに、LM や LAM は、alpha1,6-結合であるからだ。また、LM は、LAM の前駆体物質と考えられているが、明確な証拠はこれまで得られていない。

直鎖型の alpha1,6-結合マンノース鎖は、alpha1,6 マンノース転移酵素である MSMEG-4241 によって合成される。MSMEG-4241 の欠失株では、マンノースを5-20 含んだ、LM (マンノース 21-34) の中間体が蓄積する。したがって、MSMEG-4241 以外に、AcPIM4 にマンノースを付加する酵素が存在すると推定される。

MSMEG-4247 は、alpha1,2 マンノース転移酵素であるが、その欠失株は、alpha1,2 マンノース側鎖が欠失していることから、側鎖合成酵素と考えられてきた。また、MSMEG-4247 欠失株において LM が消失していることから、alpha1,2 マンノース側鎖が LM 合成に必須であることが考えられる。

このように LM や LAM の合成には、複数の酵素が関わっており、高度に合成が制御されているものと思われる。本研究では、MSMEG-4247 欠失株を作成し、LM や LAM の合成における酵素発現の役割を解析した。

B. 研究方法

菌株と変異菌の作成。 *M. smegmatis* とその遺伝子変異株は、7H9-ADC 培地で、37 度にて培養した。MSMEG-4247 遺伝子を PCR にて増幅し、pPR23-1 に挿入した。薬剤感受性とシュークロース感受性でセレクション

を行い、MSMEG-4247 遺伝子を欠失させた。また MSMEG-4247 遺伝子の出で戻しに、pMV261 や pMV306 に遺伝子を挿入して利用した。

LAM と LM の抽出と解析。培養菌体より常法により脂質成分を抽出した。それをトリス緩衝液で飽和したフェノールと水に懸濁して、55 度で 2 時間保温することで LM と LAM の抽出を行った。抽出画分を透析後、SDS-PAGE を行い、ProQ Emerald 488 カルボハイドレート染色キットにて観察した。

ウェスタンブロット。MSMEG-4241 や MSMEG-4247 の合成ペプチドを認識する抗体をアフィニティカラムにて精製した。SDS-PAGE で菌体抽出液を分画し、PVDF 膜に転写した。転写膜を 5%スキムミルクでブロックし、各種抗体と反応させた。洗浄後、2,000 倍希釈した二次抗体で反応させ、ケミルミネセンスにて反応を検出した。

倫理面への配慮 本研究は該当しない。

C. 研究結果

MSMEG-4247 遺伝子欠失株の表現型。MSMEG-4247 を欠失させた *M. smegmatis* の LM/LAM 画分を抽出して SDS-PAGE にて展開し、観察した。その結果、欠失により、LAM のサイズが減少すること、また以前に報告にあるように LM が消失することが判明した (図 1、レーン 4, 5, and 6)。

欠失株の表現型が、MSMEG-4247 の欠失によることを確認するため、MSMEG-4247 遺伝子を多コピープラスミドを利用して補填した。補填株の LM/LAM を観察した結果、LM の産生は回復したが、LM、LAM とともにサイズの減少が観察された (図 1、レーン 7 and 6)。

過剰な MSMEG-4247 の補填が、LM や LAM のサイズの短小化を促している可能性を検討するため、欠失株に単コピーの MSMEG-4247 遺伝子を導入し LM や LAM を観察した結果、野生株のそれと同等の糖脂質が合成されていることが判明した。

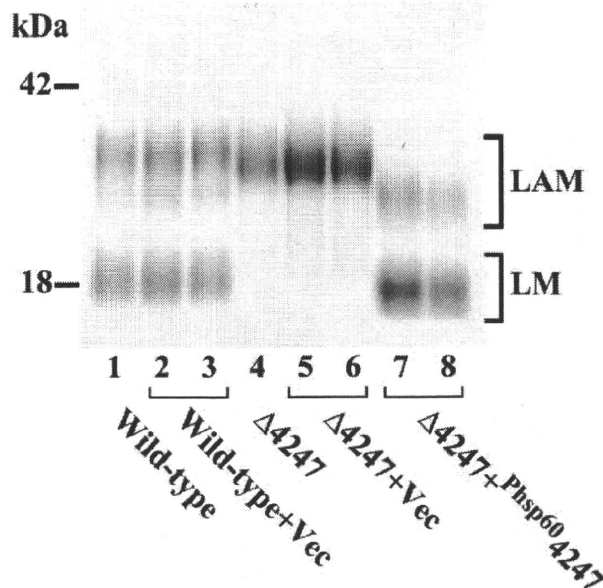


図 1、MSMEG-4247 欠失と補填による LM と LAM の観察

MSMEG-4241 と MSMEG-4247 の量比で、LM や LAM の合成サイズが調整される可能性を次に検討した。MSMEG-4247 単独の過剰発現では、LAM や LM の短小化が促進されるのに対し、両酵素を多コピーで *M. smegmatis* に発現させることにより、野生株の産生するサイズに近い LM や LAM が合成されることが判明した。

D. 考察

MSMEG-4247 (Rv2181) は、alpha1,2 マンノース転移酵素で、LAM や LM の側鎖合成に関わると考えられてきた。本研究では、直鎖伸長酵素である alpha1,6 マンノース転移酵素 MSMEG-4241 と MSMEG-4247 の量比で、LAM や LM のサイズを調整していることが判明した。この反応は、*M. tuberculosis* H37Rv 株の Rv2181 欠失株でも観察されたことから、病原性を問わず、抗酸菌で生じている調節機構だと考えられる。側鎖合成酵素の過剰発現で、LM や LAM の短小化が生じる正確な理由は分からない。alpha1,2 結合末端が、伸長酵素の反応になんらかの影響を及ぼす可能性などが考えられるが、今後の検

討課題である。

E. 結論

LM や LAM のサイズは、alpha1,2 マンノース転移酵素と alpha1,6 マンノース転移酵素の量比で調節されていることが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2010. Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int. Immunol.*, 22: 179-189.
- 2) Sena, C. B., T. Fukuda, K. Miyanagi, S. Matsumoto, K. Kobayashi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, and Y. S. Morita. 2010. Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 285: 13326-13336.
- 3) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine*, 28: 2020-2025.

2. 学会発表

- 1) 立石 善隆, 岡 真優子, 西内 由紀子, 小林 和夫, 前倉 亮治, 松本 壮吉. 感染マクロファージにおけるサイトカイン発現パターンの差異からみた肺 MAC 症の重症化機序の解明. 第 8 回感染症沖縄フォーラム 2010 年 2 月 沖縄
- 2) 岡 真優子, 平山 幸雄, 立石 善隆, 小林 和夫, 前倉 亮治, 松本 壮吉.

潜在性結核菌に対する液性免疫応答の解析. 第 8 回感染症沖縄フォーラム 2010 年 2 月 沖縄

- 3) 尾関 百合子, 菅原 勇, 岡 真優子, 小林 和夫, 松本 壮吉. 結核菌感染における制御性 T 細胞の関与. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 4) 岡 真優子, 平山 幸雄, 立石 善隆, 小林 和夫, 松本 壮吉. 潜在性結核の診断法の確立に向けた臨床への橋渡し研究; 第 1 報. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 5) 西内 由紀子, 松本 壮吉, 立石 善隆. 生活環境由来 *Mycobacterium avium* complex の遺伝子多型解析. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 横浜
- 6) 松本 壮吉. Molecular mechanisms of latent tuberculosis infection (LTBI) and development of diagnosis of LTBI. 第 3 回日中科学フォーラム. 2010 年 3 月 武漢市 中国湖北省
- 7) 松本 壮吉. 抗酸菌感染症における感染制御の進歩. 第 84 回日本感染症学会総会 2010 年 4 月 東京
- 8) 松本 壮吉. 結核菌の長生きのメカニズム; 休眠現象と潜在性結核. 第 27 回東海薬物治療研究会 2010 年 5 月 名古屋
- 9) Matsumoto, S. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. International Society for Hyaluronan Sciences 8th International Congerence Hyaluronan 2010, 2010 年 6 月 京都
- 10) 松本 壮吉. 結核菌の気道ヒアルロン酸を利用した感染と生体内増殖. 第 22 回微生物シンポジウム、2010 年 9 月 大阪
- 11) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activities: ferric iron storage and ferrous iron oxidation,

The 10th Awaji International Forum on
Infection and Immunity, 2010 年 9 月
淡路島

- 12) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, S. Kitada,
Y. Tateishi, R. Maekura, H. Sugimura,
Y. Koide, K. Kobayashi, and S.
Matsumoto. Clinical Practice for the
Diagnosis of Latent *Mycobacterium
tuberculosis* Infection, 14th
International Conference on Emerging
Infectious Diseases (EID) in the
Pacific Rim: 2010 年 10 月 Penang,
Malaysia
- 13) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa,
H. Hisaeda, K. Kobayashi, and S.
Matsumoto. Transient role of CD4⁺CD25⁺
regulatory T cells in *Mycobacterium
tuberculosis* infection in mice. 14th
International Congress of Immunology,
22-27 August, 2010, Kobe, Japan

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)

抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

分担研究報告書

研究分担者

杉田 昌彦

(京都大学ウイルス研究所・教授)

抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

分担研究者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所・教授）

研究要旨.

抗酸菌細胞壁には、抗酸菌に固有の脂質、糖脂質群が存在し、その多くは菌の生存や病原性を規定している。近年、これらの脂質、糖脂質を認識する宿主免疫経路の存在が明らかとなり、それを利用した診断法や感染制御法が模索されている。これらの解析では適切な動物モデルが必須であるが、免疫研究によく活用されるマウスやラットは、この脂質特異的免疫応答システムを欠如している。そこで本研究では、ヒト脂質特異的免疫応答システムを導入、再構築したマウスモデルを作製し、その解析研究を展開した。一方、マウスとヒトの基本的免疫システムの違いから、今後の抗酸菌脂質免疫の研究においては non-human primates の解析が必要と考え、アカゲザルの脂質免疫システムの基盤研究を展開した。本研究により確立された動物実験系は、結核免疫における脂質特異的免疫応答の解析に有用であり、結核の新たな診断法や感染制御法の確立に大きく貢献することが期待される。

A. 研究目的

タンパク質抗原を標的とした主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex: MHC) クラス I 拘束性 CD8 陽性キラーT細胞と MHC クラス II 拘束性 CD4 陽性ヘルパーT細胞は、獲得免疫機構の中心的なエフェクター細胞である。結核を含め、多くの病原体に対する生体防御がこの経路を介して行われ、さらにこの経路の人為的賦活化を目指したワクチンの開発も進められている。一方、最近の研究から、結核菌脂質を標的とした新しい獲得免疫機構の存在が明らかとなってきた。ヒトグループ 1CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) は、結核菌の宿主細胞である樹状細胞や活性化マクロファージにおいて発現し、結核菌脂質抗原を結合する。これによって活性化されたグループ 1CD1 拘束性 T 細胞群は、主としてキラーT細胞であり、感染細胞のアポトーシス誘導、殺菌物質 (グラニューリシンなど) やインターフェロン γ (IFN- γ) の産生を介して結核防御に大きな役割を果たしていることが想定されているが、その実証には適切な

動物モデルが必要である。

結核免疫応答の詳細な解析に有用なマウスやラットは、グループ 1CD1 機能を欠如している。そこで、ヒト *CD1A* ゲノム遺伝子ならびにヒト *CD1B/E* ゲノム遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、CD1a 分子や CD1b 分子の機能をマウスにおいて再構築する試みを進めた。

一方、マウスとヒトの間には、結核免疫に深く関与した CD1 拘束性 T 細胞やガンマデルタ T 細胞の存在や機能において、大きな違いが見られる。このことから、今後のヒト結核の正確な理解には non-human primates の解析基盤を確立することが必須と考えるに至った。そこで、上記トランスジェニックマウスの作製と並行して、アカゲザルにおける脂質免疫システムの基盤研究を展開した。

本課題では、これらの研究を通して、結核免疫における脂質特異的免疫応答の解析に有用な動物実験系を確立し、ヒト結核の新たな診断や予防法の開拓に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト CD1A および CD1B/E ゲノム遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立
ヒト CD1A ゲノム遺伝子ならびにヒト CD1B/E ゲノム遺伝子は、ゲノム遺伝子を鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) 法により単離した。それぞれに存在するすべてのエクソン部分の DNA 配列を決定し、遺伝子増幅に伴うエラーがないことを確認した。得られた完全長の CD1A ゲノム遺伝子、CD1B/E ゲノム遺伝子をそれぞれ定法に従って C57BL/6 マウス受精卵前核に注入し、トランスジェニックマウスを作製した。マウス個体のスクリーニングは、尾より抽出したゲノム DNA を鋳型とし、ヒト CD1A ゲノム DNA に特異的なセンスプライマー (5'-GGA AAT ACC ATC TGC AAA TGA TAT-3') とアンチセンスプライマー (5'-CCG AAT GGT GCG TAT ACG GGA TAA-3')、あるいはヒト CD1B ゲノム DNA に特異的なセンスプライマー (5'-GCT CGA GAA GTA CAA GAC TTT GCC-3') とアンチセンスプライマー (5'-GGC ACA CAT GAA GCA TTC TTG ACA-3') を用いた PCR 法により行った。樹立したトランスジェニックマウスは specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。すべてのマウス実験プロトコールは、京都大学ウイルス研究所の動物委員会の承認を得たのち実施された。

抗酸菌脂質の調製 ウシ結核菌弱毒化ワクチン株 BCG Tokyo 172 株を 7H9 標準培地で培養し、菌体を回収した。乾燥菌体をクロロホルム：メタノール (2:1)、クロロホルム：メタノール (1:1)、クロロホルム：メタノール (1:2) に順次懸濁し上清を回収した。これらの上清をまとめて窒素ガス下で乾固し、新たにクロロホルム：メタノール (2:1) に溶解したものを「BCG 総脂質」として用いた。また、ヒト結核菌 (H37Ra 株) 凍結乾燥菌体を超音波破碎後、クロロホルム：メタノール (2:1) に懸濁した。さらにクロロホルム層を回収して窒素ガス下で乾燥し、新たにクロロホルムに溶解したものを「結核菌総脂質」として使用した。

骨髄由来樹状細胞の調製 骨髄由来樹状細胞については、まずマウス大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント GM-CSF

(20ng/ml) を含む培地で 3 日間培養した後、新しい培地を加え、計 6 日間培養した。引き続き 2 日毎に培地交換を計 3 回行い、最後の培地交換から 2 日後に浮遊細胞を回収し、「骨髄由来樹状細胞」として使用した。

胸腺細胞の調製 マウス胸腺を採取し、常法にしたがい single cell suspension を得たのち、フローサイトメトリ解析に用いた。

表皮細胞の調製 マウス表皮シートおよび表皮細胞の調整においては、まず耳介を採取し、皮膚を背側面と腹側面に分離した後、37 度 1 時間ジスパーゼ酵素処理を行って、表皮シートを剥離した。さらに表皮シートを 37 度 30 分トリプシン酵素処理を施し、表皮細胞の single cell suspension を得た。

フローサイトメトリ フローサイトメトリによる CD1a 分子、CD1b 分子の検出には、それぞれ抗ヒト CD1a 抗体 (クローン 10H3)、抗ヒト CD1b 抗体 (クローン b3.1) を一次抗体として用い、常法に従い BD FACS canto II を使用した。またデータの解析には Flowjo を用いた。

マウス T 細胞応答の解析 ヒト T 細胞抗原受容体欠損 T 細胞株 (J. RT3) にマイコバクチン特異的 CD1a 拘束性 T 細胞 (CD8-2) 由来 T 細胞抗原受容体を再構築した細胞株 (J. RT3/CD8-2) を作製し、IL-2 産生を指標に T 細胞活性化を評価した。IL-2 の測定には市販のヒト IL-2 ELISA キット (BD) を用いた。また、マウス脾臓細胞を樹状細胞の存在下で抗原刺激し、抗マウス IFN- γ 抗体 (AN18) 固相化プレートにおいて培養した。上清と細胞を除去した後、市販のマウス IFN- γ ELISPOT キット (MABTECH) を用いて活性化細胞数を測定した。

アカゲザルの飼養 アカゲザルを用いた動物実験にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守した。実験実施場所である京都大学ウイルス研究所におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣の許可を受けている。また「感染症の予防

及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき、輸入サル飼育施設の指定を受けている。すべてのアカゲザル実験プロトコールは、当該施設の動物委員会の承認を得たのち実施された。

アカゲザルへの BCG 接種 末梢血を採取後、BCG (総量 1×10^8 cfu) を右上腕および下腿に皮内接種した。6 週後に再度末梢血を採取し、ELISPOT アッセイ等の免疫解析に用いた。

サル IFN- γ ELISPOT アッセイ サル末梢血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法により単核球 (CD1b 陽性細胞を含む) を単離し、抗酸菌より精製したグルコースモノミコール酸 (glucose monomycolate: GMM) を刺激抗原として 24 時間培養したのち、サル IFN- γ ELISPOT アッセイ (MABTECH) を行った。

C. 研究結果

CD1a および CD1b トランスジェニックマウスの解析 ヒト *CD1A* ゲノム遺伝子を C57BL/6 マウス受精卵に導入したのち子宮に着床させ、そこから生まれた仔 17 匹中 2 匹がゲノム中に *CD1A* 遺伝子を有していた。一方、ヒト *CD1B/E* ゲノム遺伝子を導入した受精卵からは仔 9 匹が得られ、そのうち 1 匹のみがゲノム中に *CD1B* 遺伝子を有していた。それぞれから陽性マウス 1 匹を野生型 C57BL/6 マウスと交配し、CD1a トランスジェニックマウスラインおよび CD1b/e トランスジェニックマウスラインを確立した。ともにメンデルの法則にしたがってゲノム陽性マウスが生まれ、外見上特筆すべき変化は認めなかった。

これらのマウスから骨髄由来樹状細胞を誘導し CD1 分子のタンパク質発現をフローサイトメトリにより検討したところ、CD1a トランスジェニックマウスからは CD11c 陽性 CD1a 陽性樹状細胞が確認できたが、CD1b/e トランスジェニックマウスからは、CD11c 陽性 CD1b 陽性樹状細胞が確認できなかった。また胸腺細胞における CD1 分子の発現を検討したところ、CD1a トランスジェニックマウスにおいてはほとんどすべての未熟胸腺 T 細胞が CD1a 分子を発現していたのに対し、CD1b/e トランスジェニックマウ

スの胸腺 T 細胞は CD1b 分子を発現していなかった。以上の結果から、CD1b 分子発現の構築には成功しなかったと判断し、CD1b/e トランスジェニックマウスについてはさらなる解析を断念した。

CD1a トランスジェニックマウスにおいては、さらに表皮ランゲルハンス細胞に顕著な CD1a 分子の発現が観察された。また骨髄由来マクロファージをマウスリコンビナント GM-CSF で刺激するとヒト CD1a 分子の遺伝子発現ならびにタンパク質発現が誘導できたことから、GM-CSF 受容体からの細胞内シグナルによりゲノム上のトランスジーンが発現が誘導されることが示された。以上の事実から、導入したヒト *CD1A* ゲノム遺伝子がマウス組織内で適切に発現制御を受け、ヒト個体内と同様の組織・細胞タイプ特異的な CD1a 分子発現が構築できていると判断された。

次いで、CD1a トランスジェニックマウスに発現した CD1a 分子の機能の解析を行った。まずこのマウスより得た CD1a 陽性骨髄由来樹状細胞を抗原提示細胞とし、結核菌総脂質 (CD8-2 の認識抗原であるマイコバクチン含有する) に対する J. RT3/CD8-2 の反応を、IL-2 産生を指標として検討したところ、弱いながらも抗原特異的で CD1a 拘束性の T 細胞応答が検出された。したがって、このマウスに発現した CD1a 分子が脂質抗原提示機能を有していることが確認された。次いで、BCG 接種を行った CD1a トランスジェニックマウスより脾臓細胞を採取し、BCG 総脂質に対する CD1a 拘束性 T 細胞の存在を IFN- γ ELISPOT 法を用いて検討したところ、BCG 脂質特異的 CD1a 拘束性 T 細胞応答が誘導されることを観察した。しかしながら、この応答は微弱であり、詳細な解析には困難が予想された。抗酸菌感染に対する獲得免疫機構においてはタンパク質を標的とした MHC 依存性経路と脂質を標的とした CD1 依存性経路が存在する。そこで前者を低減することにより、後者の経路が容易に検出できるのではないかと考え、この視点からの研究を開始した。CD1a トランスジェニックマウスを MHC-II ノックアウトマウスと交配し、CD1a トランスジェニック MHC-II ノックアウトマウスラインを樹立し

た。しかし、このマウスラインを用いても、CD1a 拘束性 T 細胞応答の顕著な実証には至らなかった。以上のことから、マウスにおいては、抗酸菌脂質特異的な免疫応答を担う CD1a 分子以外未同定補助分子が欠失している可能性を考え、その検証を進めている。

BCG 接種アカゲザルの解析 研究分担者・杉田の研究グループのこれまでの解析から、アカゲザルにはヒトと同様のグループ 1CD1 システムが存在することが明らかとなっている (Morita D, *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889, 2008)。そこで、アカゲザル 2 頭に BCG を皮内接種し、6 週後に末梢血を採取した。末梢血単核球と精製 GMM 抗原を用いてサル IFN- γ ELISPOT アッセイを行ったところ、免疫前には GMM 特異的 T 細胞応答がまったく確認されないのに対し、2 頭中 1 頭において、BCG 接種後、顕著な GMM 特異的 T 細胞応答が観察された。

D. 考察

抗酸菌感染応答の研究において、マウスモデルは大変有用であり、多くの重要な知見をもたらしてきたことは言うまでもない。しかし結核感受性や肉芽腫の組織構築は、マウスとヒトの間で実質的な違いが存在する。さらに、グループ 1CD1 拘束性 T 細胞や V δ 2 ガンマデルタ T 細胞など、ヒト結核の防御に貢献すると考えられる T 細胞群はマウスでは欠如している。ヒト CD1 トランスジェニックマウスの確立を目指した本研究は、このギャップを埋め、ヒトの抗酸菌脂質免疫応答をマウスでよりよく再現しようとする試みと位置づけることができる。マウスは遺伝子操作が容易であることから、CD1 トランスジェニックマウスに MHC 遺伝子あるいは MHC 機能欠損を導入することにより、感染防御や感染の各段階、各組織におけるタンパク質抗原特異的 T 細胞応答と脂質抗原特異的 T 細胞応答の「重み」の違いも明確になると期待される。そのためには、マウスにおいて欠失している可能性のある、脂質免疫を担う CD1 以外の補助分子の同定が必須であり、今後のさらなる解析

研究が必要である。

ヒト結核の真の病態解明、治療や予防への応用のためには、non-human primates の解析が不可欠であることはいうまでもない。しかしそのハードルの高さから、これまでサルを用いた抗酸菌脂質免疫応答の解析研究はほとんど遂行されなかった。本課題ではアカゲザル脂質免疫応答の解析基盤を確立し、BCG 接種アカゲザルの脂質免疫応答を検証した。そして、1 頭において、抗酸菌細胞壁糖脂質である GMM に対する特異的応答が誘起されることをはじめて明らかにした。GMM は新たな抗結核脂質ワクチンとして有用である可能性が高く、現在研究分担者が精力的に研究を進めている。今後は、この応答の時空間的評価、ならびに機能評価を詳細に進めて行くことが重要と考えられる。

E. 結論

抗酸菌脂質免疫応答を担うヒトグループ 1CD1 分子の発現を再構築したマウスの作出に成功した。しかしその「機能的」再構築は限定的な成功にとどまっている。一方、今後のヒト結核の正確な病態理解や効率的控制に向け、BCG 接種アカゲザル脂質免疫応答の解析研究を進め、その研究基盤を確立した。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 杉田昌彦. 結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答. 第 53 回日本感染症学会 中日本地方会学術集会 2010 年 11 月 京都

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