

2010 28010A

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

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる
分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究

(H20-新興-一般-010)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成23 (2011) 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

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる
分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究

(H20-新興-一般-010)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成23（2011）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる分子機構の
解明及び治療・予防の基礎研究 1
小林 和夫

II. 分担研究報告書

- 休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序 9
松本 壮吉
- 休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究 15
杉田 昌彦
- 休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析 19
宮本 友司
- 休眠期結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの
開発研究 23
小出 幸夫
- 持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発に
関する研究 27
前倉 亮治
- 持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の
新規血清診断法の開発 31
北田 清悟

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 39

I . 総括研究報告書

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）
総括研究報告書-平成 22 年度

持続性結核菌感染の病原性や発症に関わる分子機構の解明及び治療・予防の基礎研究
（H20-新興-一般-010）

研究代表者	小林 和夫	（国立感染症研究所・免疫部・部長）
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）
研究分担者	杉田 昌彦	（京都大学ウイルス研究所・細胞制御研究分野・教授）
研究分担者	宮本 友司	（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・感染制御部・主任研究官）
研究分担者	小出 幸夫	（浜松医科大学・理事、感染症学・教授）
研究分担者	前倉 亮治	（国立病院機構刀根山病院・副院長）
研究分担者	北田 清悟	（国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医長）
研究協力者	阿戸 学	（国立感染症研究所・免疫部・第二室長）
研究協力者	岡部 真裕子	（国立感染症研究所・免疫部・第二室研究員）
研究協力者	高橋 宜聖	（国立感染症研究所・免疫部・第四室長）
研究協力者	大西 和夫	（国立感染症研究所・免疫部・主任研究官）
研究協力者	藤原 永年	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・講師）
研究協力者	仁木 満美子	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・助教）
研究協力者	岡 真優子	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・流動研究員）
研究協力者	松永 勇	（京都大学ウイルス研究所・細胞制御研究分野・准教授）
研究協力者	立石 善隆	（国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科・医員）
研究協力者	菅原 勇	（前：結核研究所・抗酸菌レファレンス部長）
研究協力者	松本 真	（大塚製薬微生物研究所・所長）
研究協力者	大原 直也	（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔微生物学・教授）
研究協力者	笠間 毅	（昭和大学医学部リウマチ・膠原病内科学部門・准教授）

研究要旨

潜在性持続結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与している。代謝の低下した潜在感染（休眠）菌における「蛋白質、脂質や糖脂質」発現や機能、さらに、宿主応答が明らかとなった。抗酸菌 DNA 結合蛋白質（MDP1）は定常期以降に発現し、MDP1 が *katG* 遺伝子（抗結核薬：イソニアジドの標的）に結合することにより、イソニアジド耐性に関与していた。また、MDP1 は肺結核病変である乾酪壊死組織（低栄養・酸素部位）で高発現し、陳旧性肺結核で血清抗 MDP1 抗体価が高値を示し、抗 MDP1 抗体価が潜在性結核菌感染を反映する可能性を示唆した。感染宿主内における抗酸菌糖脂質代謝（GMM←TDM 転換）により、優位な GMM に対する免疫応答が惹起されていた。*Mycobacterium avium* complex (MAC)-GPL 糖鎖は凝集形態に影響を与えることが示唆された。潜在性結核菌感染のワクチン候補として、Rv3132 (*dosS/desS*) は T 細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、また、結核菌 HSP70 と防御抗原の融合蛋白は有望な候補抗原であると考えられた。血清 GPL core IgA 抗体価は抗酸菌化学療法実施に伴い低下傾向を示す症例が多く認められ、疾患活動性を反映し、治療効果を客観的に評価するのに有用である可能性が示唆された。肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は体外診断用医薬品として製造承認された（保険点数：120 点）。

A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、930 万人（日本：2,4 万人）が結核を発病、180 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（2009 年）。活動性結核の発病は感染者の約 10%であり、潜在性結核菌感染や発病に対する機構の解明は結核対策に寄与する。

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（70%）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診断法、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発症に関わる宿主および菌の分子機構を解明し、病態の理解、診断・治療やワクチン標的候補の探索を目的とした。

担当者	研究課題
小林 和夫	研究の総括
松本 壮吉	休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序
杉田 昌彦	休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答
小出 幸夫	休眠結核菌由来遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発研究
宮本 友司	休眠性非結核性抗酸菌における菌体構成分子の解析
前倉 亮治	持続性潜在結核菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究
北田 清悟	持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の新規血清診断法の開発

B. 研究方法

脂質や糖脂質解析

結核菌や類縁抗酸菌 *Mycobacterium avium* complex (MAC) の細胞壁から、2

次元薄層クロマトグラフィー (TLC)、イオンクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーや質量分析計を用いて、リン脂質や糖脂質を分離・精製し、構造解析した。また、精製糖脂質を用い、宿主免疫応答を検索した。

遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイによる増殖期—休眠期の抗酸菌における遺伝子発現の比較はアレイチップ (Roche Diagnostics 社) を用いて行った。ハイブリダイゼーション装置は MAUI (BioMicro 社) を、解析装置は GenePix 4000B (Axon 社)、シグナル解析は NimbleScan ver2.3 (Nimblegen 社) を用いて行った。得られたデータの解析は GeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いた。

抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) と薬剤感受性

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株 (野生型: WT) およびそれを親株とした MDP1 欠失株 (KO) ならびに補填株 (Comp) は液体培地で培養後、McFarland 0.5 相当に調製した。その後、各種薬剤を添加した液体培地に菌液を接種し 37°C で 48 時間培養した。培養後、LB 寒天培地に接種し、colony forming units (CFUs) を算出し評価した。

MAC 糖たんぱく脂質 (GPL) の解析

MAC 血清型は GPL 糖鎖部分により規定されているが、血清型の異なる MAC (1、2、4、8 型) を用い、遺伝子導入し、生合成系や GPL 解析した。

DNA ワクチンや分子融合蛋白質の免疫原性

DosR regulon 蛋白 32 種類についてマウス免疫原性を検討し、C57BL/6 マウスで 9 種類、BALB/c マウスで 12 種類の抗原が T 細胞応答を誘導できた (両系統で誘導できたものは 7 種類)。また、C57BL/6 で 3 種類、BALB/c で 13 種類の抗原が抗体産生を誘導できた (同 3 種類)。特に、Rv3132c

は両系統で両免疫応答を誘導でき、有望なワクチン候補抗原と考えられた。樹状細胞による抗原の特異的取り込みの促進を目的として、heat shock protein (HSP) 70 を利用した分子融合型ワクチンを開発した。

結核菌ゲノム情報に基づき、DosR regulon 蛋白および Rfp 蛋白をコードする遺伝子を PCR によって単離し、哺乳類細胞用の発現ベクターである pCI に挿入して、DNA ワクチン・ライブラリーを作成した。また、Histidine-tag を付加した抗原遺伝子を pET28b ベクターに挿入し、目的蛋白を大腸菌発現系によって産生させ、Ni-NTA column を用いて精製した。遺伝子銃(Helios Gene-Gun)を用いて、作成した DNA ワクチンでマウス (BALB/c および C57BL/6) を免疫 (2 μ g、2 週間隔で 3 回) した。最終免疫 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を対応する組換え抗原蛋白で 37°C、48 時間刺激し、培養上清中に産生された IFN- γ 量を ELISA 法にて測定して、T 細胞応答を検討した。加えて、免疫マウス血清中の抗原特異的な抗体価を、組換え蛋白を抗原とした ELISA 法にて測定した。

Heat shock protein (HSP) 70 との分子融合ワクチン

結核防御抗原である MPT51 と HSP70 の融合蛋白をコードする遺伝子を pCI に挿入し、遺伝子銃を用いて BALB/c および C57BL/6 マウスを免疫した。最終免疫の 2 週間後、マウスの脾臓細胞を既に同定した MPT51 由来抗原ペプチドで刺激し、interferon (IFN)- γ 産生を指標にして抗原特異的な T 細胞応答を検討した。抗原ペプチドとして、MPT51₂₄₋₃₂ (H2-D^d 拘束性) および MPT51₁₇₁₋₁₉₀ (H2-A^b 拘束性) をそれぞれ BALB/c (CD8⁺ T 細胞応答) および B6 (CD4⁺ T 細胞応答) の脾細胞刺激に使用した。さらに HSP70 の ① 全長、② N 末端側、③ C 末端側と MPT51 を融合させた 3 種類の遺伝子を構築して同様の解析を行い、増強活性の存在する部位について検討した。潜在性抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発に関する研究

陳旧性肺結核患者、非結核性抗酸菌症患者、健常人 (学生) および活動性肺結核患者を対象とした。抗原として、結核菌由来 (増殖期: ESAT-6、CFP-10、休眠期: MDP1、Acr、GlnA1、Rv0251c-HSP、Rv2658c) および MAC-GPL を用いた。比較するため、IFN- γ 遊離試験 (QFT) を解析した。

Glycopeptidolipid (GPL)-core に対する IgA 抗体を測定する血清診断キットを開発し、肺 MAC 症の診断的有用性について報告してきた。本研究では、肺 MAC 症に対する化学療法下での血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察し、治療効果の評価における有用性を明らかにすることを目的とした。肺 MAC 症と診断され、初回標準化学療法を行う患者 43 例を登録した。治療開始前および、治療開始後経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。

倫理面への配慮

生命倫理、動物愛護や遺伝子組換え実験、また、安全対策の観点から、機関で定められた規程に準拠し、機関で承認を得て実施した。なお、利益相反はなかった。

C. 研究結果

抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) と薬剤感受性

休眠菌に無効とされる抗結核薬についての感受性を比較したところ、MDP1 欠失株において感受性の増強が認められた。マイクロアレイ解析により、イソニアジド耐性関連遺伝子の発現変化を観察したところ、カタラーゼをコードする *katG* 遺伝子の発現は MDP1 欠失により増強した。さらに、アフィニティークロマトグラフィーにより得られた MDP1 結合 DNA 画分を用いた解析により、MDP1 は抗酸菌ゲノムの *katG* 領域に結合することが明らかになった。

抗酸菌糖脂質解析と宿主応答

生体内に侵入した結核菌は宿主由来グルコース基質へのミコール酸転移反応を行うことにより、TDMの産生を抑制するとともに、自然免疫刺激活性が微弱なグルコースモノミコール酸(GMM)に置換することが明らかになった。一方、新たに生成されたGMMはCD1分子を介してT細胞に提示され、Th1型サイトカイン産生を主とした遅延型アレルギー応答が誘起された。

MAC糖たんぱく脂質(GPL)の解析

異なるGPL糖鎖を発現する組換え *M. smegmatis* 株間において、凝集形態に顕著な差が観察された。

DNAワクチンや分子融合蛋白質の免疫原性

DosR regulon 蛋白 32 種類についてマウス免疫原性を検討し、C57BL/6 マウスで 9 種類、BALB/c マウスで 12 種類の抗原がT細胞応答を誘導できた(両系統で誘導できたものは7種類)。また、C57BL/6 で3種類、BALB/c で13種類の抗原が抗体産生を誘導できた(同3種類)。特に、Rv3132c は両系統で両免疫応答を誘導でき、有望なワクチン候補抗原と考えられた。樹状細胞による抗原の特異的取り込みの促進を目的として、heat shock protein (HSP) 70 を利用した分子融合型ワクチンを開発した。

持続性潜在抗酸菌感染を検出する臨床診断法の開発

血清 MDP1 抗体価は、陳旧性肺結核患者と非結核性抗酸菌症患者で健常人および活動性肺結核患者と比較して有意に高値を示した。活動性肺結核患者で陽性は2例のみであった。CFP10 抗体価は、活動性肺結核患者で他の群と比較して有意に高値を示した。

肺 MAC 症の治療開始前および、治療開始後経時的に血液を採取し、血清抗 GPL core IgA 抗体価の変化を観察した。登録後6ヶ月以上経過した症例28例について抗体価の変化を検討した。治療開始後6ヶ月後、抗体価が治療開始時と比較して低下していたのは、18例(67.9%、低下率 $57.2 \pm 8.8\%$)、

であった。活動性肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は体外診断用医薬品として製造承認された(保険点数:120点)。

D. 考察

潜在性結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約10%であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。さらに、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。

MDP1 は定常期以降に発現する蛋白であり、MDP1 が *katG* 遺伝子(抗結核薬:イソニアジドの標的)に結合することにより、イソニアジド耐性の獲得に関与する可能性が示唆された。

感染宿主内における抗酸菌糖脂質代謝(GMM<-TDM)により、優位なGMMに対する免疫応答が惹起されていることが想定される。

異なるGPL糖鎖を発現する組換え *M. smegmatis* 株間において、凝集形態に顕著な差が観察され、GPLの糖鎖構造は抗酸菌の性状に影響を与えることが示唆された。

現行BCGワクチンを凌駕するワクチン候補分子として、Rv3132 (*dosS/desS*) はT細胞応答と抗体産生を共に誘導でき、有望な候補抗原であると考えられた。

HSP70のC末端と結核防御抗原の融合蛋白を用いることにより、CD4⁺T細胞を効率良く活性化するワクチンを開発できる可能性が示された。しかし、この融合蛋白は抗原特異的CD8⁺T細胞を活性化できず、他の免疫賦活方法の併用が必要である。

結核菌 MDP1 は肺結節病変である乾酪壊死組織(低栄養・酸素部位)で高発現し、また、陳旧性肺結核で血清抗 MDP1 抗体価が高値を示すことから、血清抗 MDP1 抗体価は潜在性結核菌感染を反映することを示唆する。

血清 GPL core IgA 抗体は化学療法実施

に伴い低下傾向を示す症例が多く認められ、疾患活動性を反映し、治療効果を客観的に評価するのに有用である可能性が示唆された。今後、より長期の細菌学的検査、臨床経過との比較検討を要する。

E. 結論

- 潜在性持続結核菌感染における結核菌は休眠分子である MDP1 を介して薬剤耐性に関与していた。
- 抗酸菌糖脂質代謝状態は宿主内抗酸菌生存を反映する可能性を示唆した。
- 潜在性結核菌感染や内因性再燃のワクチン開発において、免疫原性休眠分子を同定できた。
- 血清抗 MDP1 抗体価の測定は潜在性結核菌感染の診断に有用と考えられる。
- 血清 GPL core IgA 抗体価は疾患活動性を反映し、治療効果を客観的に評価するのに有用である。
- 活動性肺 MAC 感染症の血清抗 MAC-GPL 抗体の検出による血清診断は体外診断用医薬品として製造承認された（保険点数：120 点）。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

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.
- 4) Seto, S., **S. Matsumoto**, K. Tsujimura, and **Y. Koide**. 2010. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Microbiol Immunol* 54:170-174.
- 5) Jalilian, B., A. R. Omar, M. H. Bejo, N. B. Alitheen, M. Rasoli, and **S. Matsumoto**. 2010. Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of *Mycobacterium bovis* as genetic adjuvant. *Genet Vaccines Ther* 8:4.
- 6) **Kitada, S.**, **K. Kobayashi**, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and **R. Maekura**. 2010. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. *Chest* 138: 236-237.
- 7) **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.
- 8) Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T. Yamazaki, S. Hattori, **Y. Miyamoto**, N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, and S. Yamamoto. 2010. Influence of advanced age on *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:1500-1506.

- 9) Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Masahiko, and T. T. Nguyen. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis. 52: e127-e132.
- 10) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. Traffic (in press)
- 11) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and Y. Koide. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70. FEMS Immunol. Med. Microbiol. (in press)
- 12) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hozumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. Procedia Vaccinology 3: 19-26.
- 13) Nagata, T., and Y. Koide. 2010. Induction of specific CD8 T cells against intracellular bacteria by CD8 T-cell-oriented immunization Approaches. J. Biomed. Biotechnol. 764542.
- 14) Eweda, G., D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine 28: 4616-4625.
- 15) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. Vaccine 28: 2026-2031.
- 16) 松本 壮吉. 分子生物学から見た結核研究の現在. 四元秀毅、倉島篤行. 結核 Up to Date 改訂3版 四元秀毅、倉島篤行 編集. 2010年 南江堂 p183-189.
- 17) 岡 真優子、前倉亮治、小林和夫. 2010. 潜在性結核菌感染診断法確立の可能性. Medical Tribune 43 : 30.
- 18) 小林和夫. 2010. 感染症の現状と制圧戦略. 昭和医会誌 70 : 70-73.
- 19) 永田 年、小出幸夫. 2010. 結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み. 日本細菌学雑誌 65: 309-324.
- 20) 辻村邦夫、小出幸夫. 2010. 結核菌抗原認識とT細胞免疫. 結核 85: 509-514.
- ## 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 中国湖北省武漢市
 - 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, Sohkichi Matsumoto, International Society for Hyaluronan Sciences 8th International Conference on 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) 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, Kobe, Japan. 2010 年 8 月 神戸
 - 12) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, K. Kobayashi, 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
 - 13) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, S. Kitada, Y. Tateishi, R. Maekura, H. Sugimura, Y. Koide, K. Kobayashi, 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 Malaysia
 - 14) 大原直也、山本三郎、瀧井猛将、藤原永年、前山順一、小林和夫. 2010. DNA マイクロアレイを用いた BCG Tokyo 172-I に存在するサブポピュレーションの遺伝子発現の比較検討. 結核、85 : 407、2010. 第 85 回日本結核病学会総会 (京都、5 月) .
 - 15) Sugita M. 2010. Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, MA, U.S.A., 7 月).
 - 16) 杉田昌彦. 2010. ミコール酸含有糖脂質の生合成と免疫認識～抗酸菌バイオロジーの新たな世界～ 第 85 回日本結核病学会集會 (京都、5 月)
 - 17) 杉田昌彦. 2010. 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會 (京都、10 月)
 - 18) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 牧野正彦. 2010. 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 (鹿児島、5 月).
 - 19) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 2010. 抗酸菌ファージ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 (鹿児島、5 月).
 - 20) Miyamoto, Y. and M. Makino. 2010. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, United States of America, 7 月)

- 21) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. プロテオミクスによる結核菌ファゴソームにおける小胞輸送機構の解析. 第 93 回日本細菌学会関東支部総会 (東京、10 月) .
- 22) **Koide, Y.**, S. Seto, and K. Tsujimura. 2010. Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7 月)
- 23) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, K. Tsujimura, and **Y. Koide**. 2010. Immune responses against dormancy-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. (Boston, USA, 7 月)
- 24) 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2010. イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖. 第 85 回結核病学会総会 (京都、5 月) .
- 25) **Kitada, S.**, A. Levin, M. Hiserote, B.J. Clark, R.J. Harbeck, K.A. Lichtenstein, C.A. Czaja, G.A. Huitt, S.H. Kasperbauer, C.M. Perez-Velez, C.L. Daley. 2010. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in the United States. American Thoracic Society International Conference (New Orleans LA, USA, 5 月)
- 26) 上浪 健、北田清悟、好村研二、各務慎一、立石善隆、元根正晴、三木真理、三木啓資、平賀通、**前倉亮治**. 2010. 長期にわたり経過観察し得た肺 MAC 症の臨床的検討. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会(京都、4 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠結核菌の蛋白質発現と長期生存の分子機序

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）
研究協力者 仁木 満美子 （大阪市立大学大学院医学研究科細菌学）

研究要旨

結核菌は、人類の 32%に一部休眠状態で潜伏感染しており、成人型肺結核の多くが潜伏感染菌による内因性の再燃である。現行の抗結核薬は休眠菌には無効であることから、休眠期独自の代謝経路の存在が伺われる。我々は、休眠状態の抗酸菌菌体内で発現するヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) による菌の薬剤抵抗性への関与について研究を行った。休眠菌に無効とされる抗結核薬についての感受性を比較したところ、MDP1 欠失株において感受性の増強が認められた。マイクロアレイ解析により、イソニアジド耐性関連遺伝子の発現変化を観察したところ、カタラーゼをコードする *katG* の発現が MDP1 欠失により増強することがわかった。さらに、アフィニティークロマトグラフィーにより得られた MDP1 結合 DNA 画分を用いた解析により、MDP1 はゲノム上の *katG* 領域に結合することが明らかになった。MDP1 は定常期以降に発現する蛋白であることから、休眠菌によるイソニアジド耐性の獲得に MDP1 が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核は結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* を起因菌とする世界最大の細菌感染症である。結核菌の大きな特徴の一つとして、菌が定常期以降に増殖を停止した、いわゆる休眠状態で長期間生存可能である点あげられる。そのため、結核菌は宿主体内においても感染後すぐに結核を発症させることなく、休眠状態で潜伏感染することが可能である。現在世界人口の1/3が結核菌に感染しており、これらの多くが潜伏感染である。また、全世界の結核死亡数は年間およそ200万人にのぼるが、その多くが過去に感染し、休眠状態にあった結核菌の再燃によるものである。しかしながら現行の抗結核薬は休眠菌には無効であり、今日でも結核治療には長期間を要する。以上のことから、休眠期特有な代謝システムを解析することにより、より迅速かつ効果

的な新規結核治療法の開発の糸口が得られると考えられる。そこで我々は定常期以降の抗酸菌菌体内に大量に発現する蛋白質であり、染色体の安定化およびストレス防御に関与するとの報告がなされている転写因子であるMDP1に着目し、この分子が菌の薬剤感受性に何らかの影響を与えるかについて解析を行った。

B. 研究方法

1. 薬剤感受性試験

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 株 (WT) およびそれを親株とした MDP1 欠失株 (KO) ならびに補填株 (Comp) については、LB 液体培地にて 37°C で好氣的に培養したのち、新鮮培地にて McFarland 0.5 相当に調製した。その後、各種薬剤を添加した LB 培地に菌液を接種し 37°C で 48 時間培養した。培養後、LB 寒天培地に接種し、CFU を算出して薬剤非添加

で培養した際の CFU と比較した。

2. DNA マイクロアレイを用いた MDP1 欠失による遺伝子発現変化の解析

M. smegmatis WT 株および KO 株を好氣的に 3 日間培養し、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体は Trizol で懸濁したのち、ガラスビーズ含有マイクロチューブに移し、BeadBeater にて 5,000 rpm, 20 秒を 3 回繰り返して機械的に破碎した。その後遠心分離ののち上清を回収し、フェノール/クロロホルム処理にて除蛋白を行った。Total RNA の精製はエタノール沈殿およびカラム精製にて行った。マイクロアレイ解析はロシュ・ダイアグノスティック株式会社のなんでもアレイチップを用いて行った。ハイブリダイゼーション装置は MAUI (BioMicro 社) を、解析装置は GenePix 4000B (Axon 社)、シグナル解析は NimbleScan ver2.3 (Nimblegen 社) を用いて行った。得られたデータの解析は GeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いた。

3. ヘパリンカラムを用いた MDP1 結合性 DNA 断片の調製

M. smegmatis WT 株および KO 株を LB 液体培地で培養し、最終濃度が 1% になるようにホルムアルデヒドを添加したのち 37°C, 30 分加温した。その後菌体を回収し、PBS で懸濁した後超音波破碎機を用いて破碎し、遠心分離により上清を回収した。ヘパリンカラムに添加し、ヘパリン結合性蛋白質画分を抽出した。その後、90°C, 30 分加熱し、蛋白質の脱架橋を行った。フェノール処理により除蛋白を行い、エタノール沈殿により DNA 断片を精製した。得られた DNA 断片を鋳型として、イソニアジド耐性関連遺伝子である *kasA* および *katG* に対する特異プライマーを用いた PCR 反応を行った。

倫理面への配慮 本研究は該当しない。

C. 研究結果

1. MDP1 は *katG* の発現を抑制することに

よりイソニアジド耐性に関与する。

M. smegmatis WT, KO, Comp 株において、各種抗生剤に対する感受性を比較した。その結果、蛋白合成阻害作用を有する抗結核薬であるストレプトマイシンに対する感受性が、MDP1 欠失により増強することが明らかになった。同じく蛋白合成阻害剤であるエリスロマイシンに対しては MDP1 欠失により感受性の減弱が認められることから、この現象が MDP1 欠失により菌の蛋白合成能自体が減弱したことによるものではないことが示唆された。一方、抗結核薬であり、一般に休眠菌には無効とされている薬剤イソニアジドに対する感受性は、MDP1 欠失により増強することがわかった。イソニアジド耐性については、いくつかの遺伝子の関与がすでに報告されているため、マイクロアレイ解析によりこれらの遺伝子の発現の変化を MDP1 の有無で比較した。その結果、イソニコチン酸アシルと NADH をカップリングし、イソニアジドを活性型に変化させるカタラーゼをコードする遺伝子 *katG* の発現が MDP1 欠失により有意に増強することがわかった。以上のことから、MDP1 が *katG* の転写を抑制し、イソニアジドが活性型に転じるのを抑制することにより薬剤耐性を獲得している可能性が示唆された。

2. MDP1 はゲノム上の *katG* 領域に結合する。

これまでの研究により、MDP1 は *in vitro* において DNA に結合し、転写および翻訳の抑制を行うことが明らかになっている。そこで、MDP1 がゲノム上の *katG* 領域に結合するか検討を行った。これまでの研究により、MDP1 はヘパリンに親和性を持つことがわかっているため、*M. smegmatis* WT 株および KO 株についてホルムアルデヒドによる DNA-蛋白質間の架橋を行い、ヘパリン結合性蛋白質画分を抽出した。得られた画分についてウエスタンブロット解析を行い、WT 株から得られた画分のみが抗 MDP1 抗体に反応することを確認した。そこで、それぞれの画分を加熱により脱架橋し、DNA 断片のみを回収した。こうして得られた

DNA 画分を鋳型とした PCR を行ったところ、WT 株から得られた DNA 断片を用いたときのみ *katG* 特異プライマーによる増幅が認められた。これに対し、*kasA* 特異プライマーによる PCR では、WT 株、KO 株ともに DNA の増幅が認められた。以上のことから、MDP1 はゲノム上の *katG* 領域に結合することが明らかになった。

D. 考察

生体内において、休眠菌はすべてが完全に代謝を停止した状態ではなく、一部は再増殖しながら一定の生菌数を維持していると考えられる。また、宿主の免疫低下などの環境変化に応じてすみやかに再燃できるような代謝経路を維持していると考えられる。このような休眠菌の生物学的状態は、ストレス環境下において一部の細菌により形成される、耐久性の高い細胞構造である芽胞のそれと類似していると考えられる。芽胞内においては、ヒストン様蛋白質が染色体の安定化およびストレス防御に関与するとの報告がなされている。MDP1 も、定常期以降の抗酸菌体で発現が増強することが報告されており、他のヒストン様蛋白質同様、DNA と強固に結合し、転写や翻訳を制御する機能を有している。また、抗酸菌 MDP1 欠失株においては休眠後の生菌数が野性株と比較して顕著に減少することから、MDP1 は休眠菌が長期生存するために必要な代謝経路の転写を制御していると考えられている。本年度の研究では、MDP1 が *katG* の転写を抑制することにより抗結核薬イソニアジドに対する菌の感受性が変化することを明らかにした。イソニアジドが休眠状態の菌に無効であることについてはその現象のみが報告されており、耐性獲得メカニズムについては不明であったため、その一部が本研究により解明されたと考えられる。これまでの研究においても、MDP1 欠失により休眠時における遺伝子発現の顕著な抑制が起こることが明らかになっていることから、この分子が休眠期特異的な代謝の調節を司り、休眠菌の薬剤抵抗性に関与していると考えられる。休眠状態の菌に

有効な薬剤の開発には休眠期特異的な代謝に関与する分子の同定が必須であると考えられることから、MDP1 がゲノム上のどの領域に結合し、どの分子の転写を調節しているかを明らかにすることにより、新たな薬剤ターゲットの同定が期待される。

E. 結論

MDP1 は結核菌の休眠の導入と維持に重要な分子と考えられ、またこの蛋白による転写・翻訳の制御により、定常期以降の菌の代謝が選択的に抑制され、休眠期特異的な代謝活動の維持が行われることが示唆された。

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.
- 4) Seto, S., **S. Matsumoto**, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in

macrophages. *Microbiol Immunol* 54:170-174.

- 5) Jalilian, B., A. R. Omar, M. H. Bejo, N. B. Alitheen, M. Rasoli, and S. Matsumoto. 2010. Development of avian influenza virus H5 DNA vaccine and MDP-1 gene of *Mycobacterium bovis* as genetic adjuvant. *Genet Vaccines Ther* 8:4.

総説

- 1) 西内 由紀子、立石 義隆、松本 壮吉. 生活環境における非結核性抗酸菌の分布. 化学療法の領域. 2011 出版予定
- 2) 仁木 満美子、松本 壮吉. 結核研究の新たな展開：潜在性結核と結核菌—休眠現象の分子メカニズム. 最新医学 Vol 66 巻 3 号. 2011 出版予定

著書

- 1) 松本 壮吉. 分子生物学から見た結核研究の現在. 四元秀毅、倉島篤行. 結核 Up to Date 改訂 3 版 四元秀毅、倉島篤行編集. 2010 年 南江堂 p183-189.
- 2) 西内 由紀子、立石 善隆、山田 毅、松本 壮吉. 人獣共通感染症. 木村 哲、喜田 宏 編集. 非結核性抗酸菌症 改訂版. 医薬ジャーナル社. 2011 出版予定
- 3) Niki M and Matsumoto S. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 2011 in press

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 中国湖北省武漢市
- 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, Sohkiichi Matsumoto, 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) 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, Kobe, Japan. 2010年
8月 神戸

- 12) Osada-Oka, M., M. Takatsuka, K. Kobayashi, **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
- 13) Osada-Oka, M., Y. Hirayama, S. Kitada, Y. Tateishi, R. Maekura, H. Sugimura, Y. Koide, K. Kobayashi, **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 Malaysia

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 |

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野）
研究協力者 松永 勇（京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野）

研究要旨

結核菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は宿主環境との接点に存在することから、宿主との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わると考えられる。とりわけ、休眠菌のように年余にわたって宿主環境に暴露される場合、人工培養菌とは異なる糖脂質代謝とそれに対する宿主応答の存在が想定される。結核菌細胞壁には、自然免疫刺激活性の強いトレハロースジミコール酸(TDM)が多量に存在すると考えられてきた。しかし、研究分担者らのこれまでの研究から、生体内に侵入した結核菌は宿主由来グルコース基質へのミコール酸転移反応を行うことにより、TDMの産生を抑制するとともに、自然免疫刺激活性が微弱なグルコースモノミコール酸(GMM)に置換することが明らかになった。一方、新たに生成されたGMMはCD1分子を介してT細胞に提示され、TH1タイプのサイトカイン産生を主体とした遅延型アレルギー応答が誘起される。これらの事実は、GMM特異的免疫応答の検証が、潜伏感染や再燃を含めた生体内結核菌の免疫制御に重要であることを示している。

A. 研究目的

TDMは抗酸菌細胞壁表層に多量に存在するミコール酸含有糖脂質のひとつであり、強力な生物活性を有することから、その生合成の制御は、菌にとってもまた宿主防御においても重要な意味を持つ。抗酸菌細胞壁脂質の構造や組成、生物学的活性を検証したこれまでの研究の多くは、最適化された標準人工培地で培養した菌を用いてきた。しかし、結核菌などの抗酸菌は細胞内寄生細菌であり、宿主との密接な相互作用を通して感染が成立する。したがって、抗酸菌による感染とりわけ長期に宿主環境に暴露される潜伏感染の理解においては、宿主環境により制御される糖脂質代謝の存在とその分子機構の解明が不可欠である。とくにTDMが持つ極めて強い宿主自然免疫刺激活性（アジュバント活性）は感染の成立に不都合であることから、生体内生育菌あるいは休眠菌ではその産生が負に制御されている可能性が考えられる。

研究分担者のこれまでの研究から、宿主生体内において結核菌はTDMの産生を迅速かつ効率的に抑制する機構を有していることが明らかとなった。ミコール酸転移酵素は、1分子のトレハロースモノミコール酸（TMM）からもう1分子のTMMへミコール酸を転移させることにより、TDM合成の最終ステップを触媒する酵素である。しかしながら、グルコースが高濃度に存在する宿主生体内においては、グルコースに対するミコール酸転移反応が競合的に行われ、TDMの産生が抑制されるとともに、新たにグルコースモノミコール酸（GMM）が生成される。GMMはTDMに比して、極めて弱い自然免疫刺激活性しか持たないため、この置換反応は菌による自然免疫からのエスケープ機構を位置づけることができる。

一方、GMMはヒトCD1b分子によってT細胞に提示されることから、宿主内結核菌が新たに合成したGMMを標的にした獲得免疫が機能して菌の制御を行う可能性を考

えた。そこで本研究においては、ヒトと類似した CD1 システムを有するモルモットを用い、BCG 感染によって誘起される GMM 特異的 T 細胞応答の存在とその実態の検証を行った。

B. 研究方法

BCG の培養 BCG (Tokyo 172 株) は 0.05% Tween 80、10% ADC エンリッチメントならびに 5% グルコースを含有した 7H9 メディウムを用い、37 度で培養した。また、7H9 メディウムで培養した *M. tb* をマウス一匹あたり 100 個経気道的に感染させ、約 3 週後に感染肺を回収し、脂質解析を行った。

GMM 精製 脂質の精製は研究分担者らが確立した方法により行った (J. Biol. Chem. 283: 28835, 2008)。菌体より抽出した総脂質をクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)に溶解したのち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィー(TLC)により展開し、GMM を含んだ分画を単離精製した。精製した GMM をマススペクトロメトリに供し、分子確認を行った。さらに得られた GMM を、ステアリン酸付加オクタアルギニンを含むリポソームに封入した。

GMM 特異的 T 細胞アッセイ GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞より単離した T 細胞抗原受容体遺伝子を Jurkat 変異株に導入し、特異的 T 細胞抗原受容体を再構築した。この細胞の IL-2 産生を指標として、GMM 特異的応答を検証した。抗原提示細胞として、ヒト単球由来樹状細胞ならびにヒト CD1b cDNA を導入した B 細胞株トランスフェクタントを用いた。

モルモット 3 週齢のメス Hartley モルモットは、日本 SLC より購入し、SPF 環境下で飼育した。BCG (5×10^7 CFU) を皮内投与し、6 週後に purified protein derivative (PPD)、GMM (5 μ g) 含有リポソームおよびコントロールリポソームを皮内接種した。皮膚反応を経時的に観察するとともに、一部のモルモットにおいては皮膚組織を採取

し、常法に従ってヘマトキシリンエオジン染色を行うとともに、抗モルモットヘルパー/インデューサー T 細胞抗体 (CT7) および抗モルモット CD8 抗体 (CT6) を用いた蛍光染色を施行した。

サイトカイン mRNA 発現解析 BCG 免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、PPD (0.5 mg/ml) あるいは GMM リポソーム (1 mg/ml) 存在下で培養した。一部の実験においては、抗モルモット CD1 抗体 (CD1F2/6B5、10 mg/ml) を添加した。18 時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータル RNA を単離した。さらに oligo(dT)を用いた常法に従い、逆転写反応を行い、鋳型となる一本鎖 DNA を作成した。RT-PCR に用いたプライマーは下記の通りである。IFN-g : 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3' (sense)、5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3' (anti-sense) ; TNF-a ; 5'-CCA TGA GCA CAG AAA GCA TGA TCC G-3' (sense) 、5'-CTC ACA GGG CAA TGA CCC CAA AGT A-3' (anti-sense) ; IL-5 : 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3' (sense) 、5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3' (anti-sense) ; IL-10 : 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3' (sense) and 5' -TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3' (anti-sense) 。

倫理面への配慮

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、機関で定められた規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行した。

C. 研究結果

GMM 含有リポソームによって、効率的な抗原提示が誘導できる これまでの研究において、ソニケーションにより水溶媒系に強制分散させた精製 GMM をモルモットに皮内接種しても有意な皮膚応答を誘起できなかった。その理由のひとつとして、高度な疎水性を有する GMM が生体内で利用されにくい可能性を考え、GMM をリポソームに封入することを試みた。ソニケーション