

を Fas-independent, granule-dependent の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている<sup>9)</sup>。この T 細胞は CD1c-restricted でミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1c と結合) 等の結核菌 lipid と lipoglycan を認識する。このキラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。

一方、キラー T の TRAIL とパーフォリンが抗結核免

疫に重要である興味深い結果を得た (Fig. 2)。

### Ⅲ. granulysin と結核

キラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysin は病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下で Mφ 内の結核菌も殺すと考えられている。これ

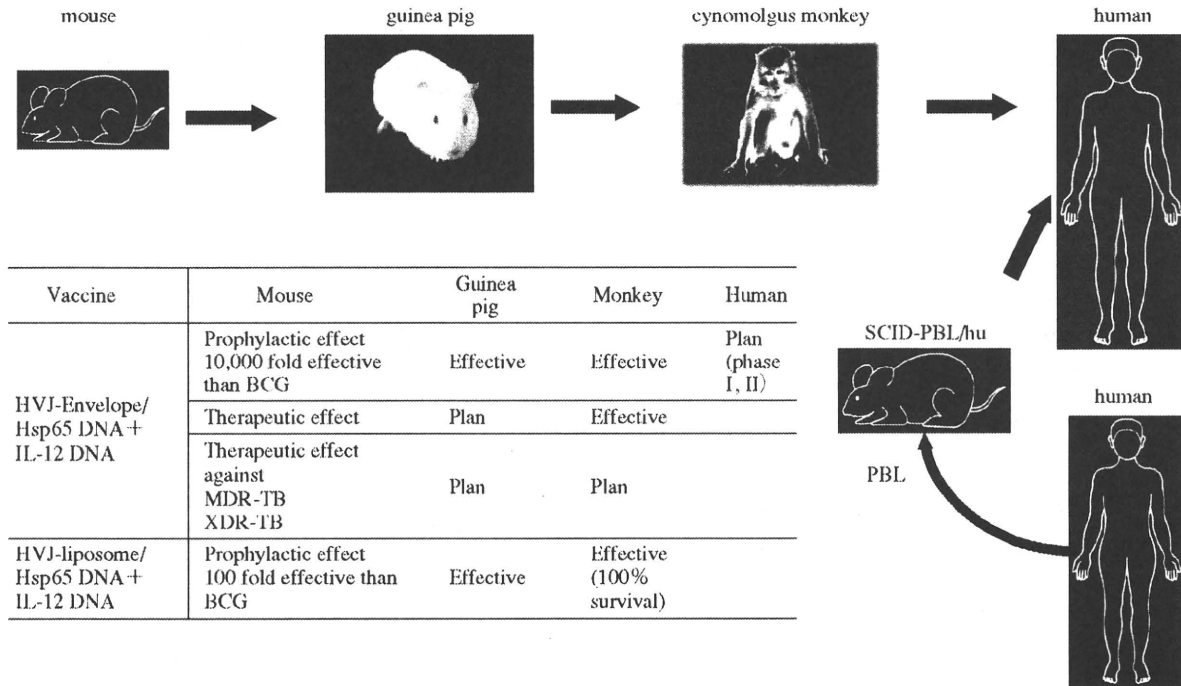


Fig. 1 The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

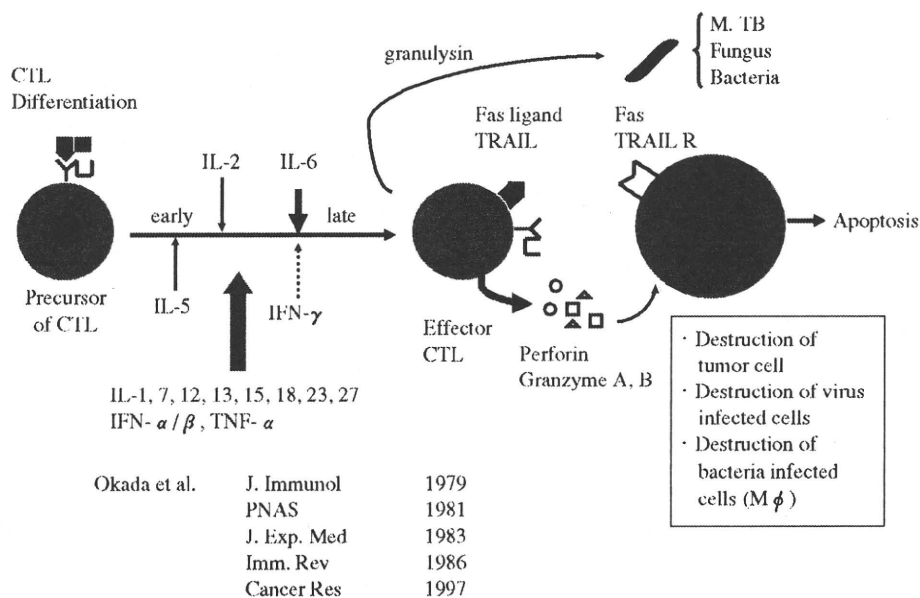


Fig. 2 Induction of cytotoxic T cells and killing mechanism

**Table 1** Induction of decrease in TB number *in vivo* and CTL differentiation by 15K Granulysin and 9K Granulysin

Two kinds of Granulysin Function	Decrease in TB number	Induction of CTL against TB	Proliferation of T cells against TB	IFN- $\gamma$ production	Granulysin expression in CD8 <sup>+</sup> T	
					Patients with MDR-TB	Patients with Drug-sensitive TB
15K Granulysin	++ (strong augmentation)	++	++	++	↓↓	↓
9K Granulysin	++	+ (augmentation)	+	++	N.D	N.D

++; strong augmentation, +; augmentation  
 ↓↓; strong suppression, ↓; suppression

はパーフォリンより M $\phi$  に穴が開き、M $\phi$  内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと思われる。われわれは結核患者、特に多剤耐性結核患者ではキラー T リンパ球の mRNA の発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした<sup>14) 15)</sup>。すなわち、われわれはキラー T 細胞の granulysin (分子量 9000) 産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。

一方、granulysin がキラー T 分化因子の一つであることを発見し、マウスで結核治療効果を示した(特許取得)。granulysin 遺伝子導入マウスを作製した。

#### IV. 新しい結核ワクチン (HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン, granulysin ワクチン等) 開発

結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、②DNA ワクチン、③リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む)、その他に大別される。

(1) DNA ワクチン: BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

マウスの結核感染系では BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれは Hsp65 DNA+IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンは BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。

この HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると、マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン投与の 1 万分の 1 以下となった。これを 1 万倍強力という。

さらに、結核菌に対する CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を増強した<sup>4)</sup>。この強力なワクチン効果とキラー T 活性が相関した。また Th1 細胞の分化誘導、IFN- $\gamma$  産生の増強をこのワクチンが発揮することも明らかにした。

この新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB WGND (Working Group on New Drugs) に選出された。

(2) リコンビナント BCG ワクチン

**Table 2** Therapeutic efficacy against tuberculosis by 15K granulysin Transgenic mice and 9K granulysin Transgenic mice

Tg mouse	CFU of TB (log)
15K Granulysin Tg mouse	5.3 ± 0.1*
wild type C57BL/6 mouse	5.9 ± 0.2
9K Granulysin Tg mouse	5.8 ± 0.4*
wild type C57BL/6 mouse	6.7 ± 0.2
Secreted 9K Granulysin Tg mouse	5.7 ± 0.6*
wild type C57BL/6 mouse	6.7 ± 0.2

CFU; Colony Forming Unit

\*; significant (P < 0.05) by Student's Test

BCG 東京菌に、種々の遺伝子を導入しリコンビナント BCG を作製した。われわれは Ag85A + Ag85B + MPB 51 リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを明らかにした<sup>5)</sup>。

さらに、サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られた Mtb72f 融合タンパク質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG ワクチンはサルでも結核予防効果を示した (Fig. 1)<sup>6)</sup>。

(3) granulysin ワクチン (Table 1, Table 2)

キラー T 細胞は結核感染防御に重要な働きをする<sup>3) 4)</sup> (Fig. 2)。granulysin 蛋白発現を多剤耐性結核や糖尿病患者の難治性結核の PBL の培養上清中の活性で検討した。その結果 IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 のキラー T 細胞分化因子のみでなく granulysin (15K Granulysin) の産生低下を認められた<sup>14) 15)</sup>。

さらにわれわれは 15K Granulysin が CD8<sup>+</sup> キラー T 細胞から直接分泌され、ヒトの M $\phi$  に直接入り、M $\phi$  内の結核菌を殺傷することを明らかにした<sup>14) 15)</sup>。薬剤感受性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は健康人よりも有意に低下していた<sup>14) 15)</sup> (Table 1)。さらに、多剤耐性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は、有意差をもって、薬剤感受性結核患者のそれらよりも低下していた (Table 1)。また、多剤耐性結核患者の PBL を PHA-P, ConA, アロ抗原 (CESS), PPD 抗

原で刺激すると, 15K Granulysinの培養上清中への分泌が低下していることを明らかにした (Table 1)。

15K Granulysinの遺伝子導入マウスと9K granulysin遺伝子導入マウスをそれぞれ作製し, *in vivo*の抗結核作用を解析した。Table 2に示したごとく, 15K Granulysin transgenic (Tg) マウスの結核菌感染4週間後の肺結核菌数 (CFU) は wild typeマウスに比較して低下が認められ

た。また9K Granulysin Tgマウスの肺内結核菌数も wild typeマウスに比較して低下していた (Table 2)。さらに, これらの2つのTgマウス (15K Granulysin Tgと9K Granulysin Tg) は *in vivo*のキラー T誘導 (結核に対する)の増強, 結核に対するT細胞増殖反応の増強やIFN- $\gamma$ 産生の増強等を示した。これらの生体内における15K Granulysinと9K Granulysinの結核感染に対する効果は世

Table 3

A. Priming, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. rBCG30	リコンビナント 85B BCG
b. rBCG30 $\Delta$ ureC: Hly (VPM1002)	リコンビナント listeriolysin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perfringiolysin
d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFN $\gamma$	リコンビナント 85B BCG
e. Nas L3/Htk BCG	鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株
f. mc <sup>2</sup> 6220, mc <sup>2</sup> 6221, mc <sup>2</sup> 6222, mc <sup>2</sup> 6231	nor-replicating, <i>M. tuberculosis</i> strain ( $\Delta$ lys A $\Delta$ pan CD)
g. mc <sup>2</sup> 5059	replicating pro-apoptotic <i>M. bovis</i> BCG株 ( $\Delta$ nuoG)
2. Phase I 2009 or Later	メチル化 21-K Da 蛋白
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	弱毒化ヒト結核菌 (virulence geneの pho Pの不活性)
b. Attenuated Live Vaccine based on Phop	anti-apoptotic 酵素活性を減弱
c. paBCG (pro-apoptotic BCG)	
B. Boosting, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. MVA85A	リコンビナント MVA (Ag85Aを発現した)
b. M72	Mtb32 + Mtb29の fusion 蛋白
c. AERAS-402	Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing <i>M. tuberculosis</i>
d. SSI Hybrid-1	antigens Ag85A,
e. SSI HyVac4/AERAS-404	Ag85B, and TB 10.4.
f. AERAS-405	fusion 蛋白 (Ag85B-ESAT-6)
g. r30	fusion 蛋白 (Ag85B-TB10.4)
h. Nas L3/Htk BCG	Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid (Ag85A,
	85B, Rv3407, latency antigen)
2. Phase I: 2009 or Later	リコンビナント Ag85B 蛋白
a. Hsp C <sup>TM</sup> TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs)
b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	Nasal vaccine/Man capped
c. NasL3/AM85B conjugate	Arabinomannan oligosaccharide
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC <sub>2</sub> SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC <sub>2</sub> SGL Mycobacterial lipids
g. HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	M.Okada, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
C. Post Exposure— Immunotherapy	
1. Phase I: 現在—2008年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	Fragmented <i>M. tuberculosis</i> cells
b. MVA85A	naked hsp 65 DNA vaccine
c. RUTI	Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
d. Nas L3/Htk BCG	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
2. Phase I: 2009 or Later	Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
a. NasL3/AM85B conjugate	Epitope-based DNA-prime/peptide-boost vaccine. (liposomeと CpG アジュバント)
b. hspDNA vaccine	
c. HG856A	
d. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
e. HG856-BCG	
f. HG856-SeV	
g. TB Vax	
h. F36, F727	
i. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	
j. AC <sub>2</sub> SGL Diacylated Sulfoglycolipid	

界に先駆けての発見である。実際リコンビナント granulysin ワクチンや granulysin DNA ワクチンはマウスで結核治療効果を示した<sup>14)15)</sup>。したがって granulysin ワクチン治療は MDR-TB や XDR-TB に対しきわめて有用な治療法となるであろう。

V. 新しい結核ワクチンの開発状況 (臨床応用)

(1) Stop TB Partnership

Stop TB Partnership (WHO) は 2008 年に現在進行中で、しかも臨床応用に有望な新しい結核ワクチン開発のリストを発表した。

われわれの HVJ/Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンも

候補の一つとしてその中に推奨されている (Table 3)。表内で太字で示したワクチンが評価されている。

2006~2015年 Global Plan to Stop TBとして新しい有効な結核ワクチン開発、2050年までに結核撲滅、が WHO の目標である。

(2) 結核ワクチンの応用の可能性

①新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996参照) を用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン 2 種を開発した<sup>6)8)</sup>。すなわち, 現在最も有力なものとして HVJリ

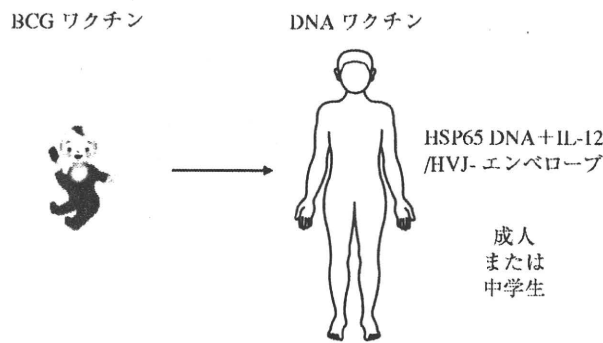


Fig. 3 新しい結核予防ワクチン (案) (DNA ワクチン)

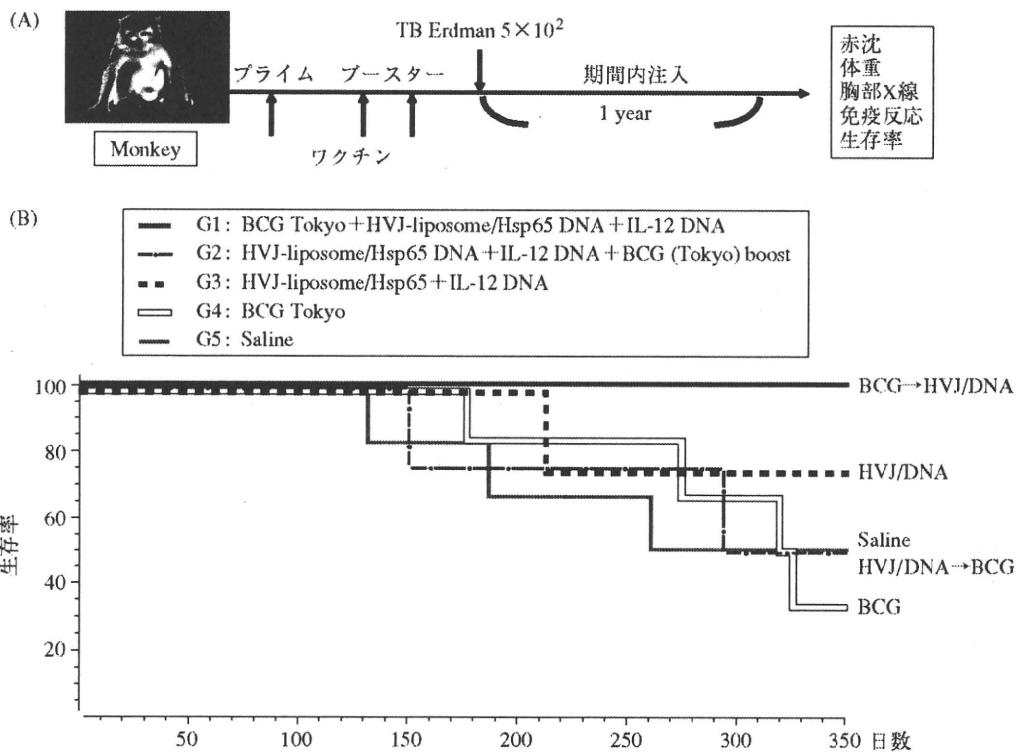


Fig. 4 ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた HVJ-リボソーム/HSP-65 DNA + IL12 DNA ワクチンの結核予防効果



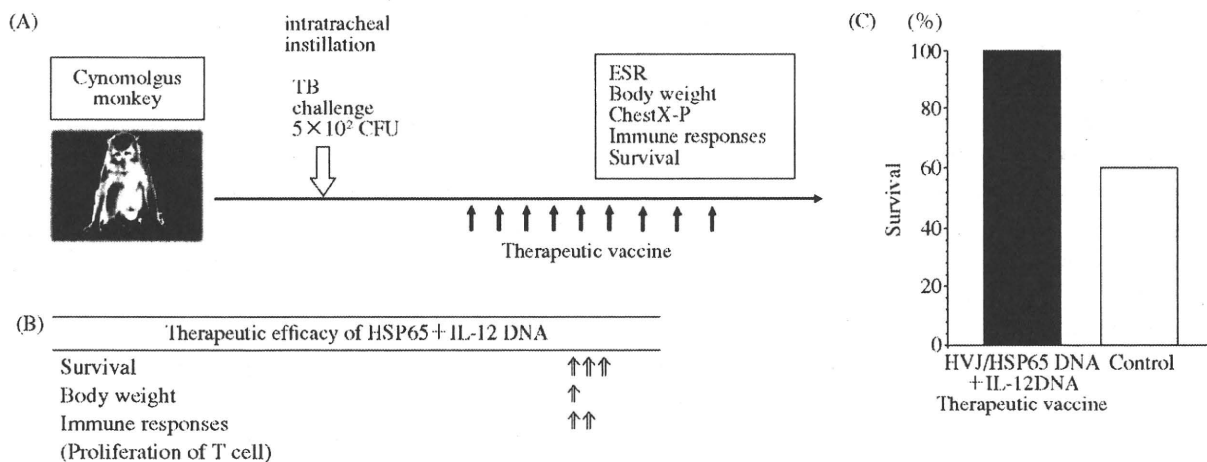


Fig. 5 Therapeutic effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12DNA vaccine on TB-infected cynomolgus monkeys

ボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンおよび, r72f BCG ワクチンがあげられる。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質 (Anderson 博士ら) も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという。72f 融合タンパクサブユニットワクチン<sup>16)</sup>, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンは第 II 相, r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相 clinical trial となっている<sup>16)</sup>。Dr. A. Hill らのワクシニアウイルス-85A DNA ワクチンは, アフリカでの第 I 相 clinical trial では, 85A DNA 蛋白に対する免疫応答増強が認められた<sup>17)</sup>。

②プライミング-ブースター法 (乳幼児 BCG—成人 HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン)

さらに BCG ワクチンをプライムし, 新しいワクチンをブースターする方法を用いた。サルでこのプライミング-ブースター法で 100% の生存を示した<sup>3)</sup> (Fig. 2)。一方, BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった<sup>3)</sup>。このように, ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンをわれわれは世界に先駆けて開発した。すなわち, 本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることにより, プライミングワクチンとして BCG ワクチンを用い, 成人ワクチン (中学生, 成人, 老人) としてこの DNA ワクチンをブースターワクチンとして用いる結核ワクチンの臨床応用案である (Fig. 3)。

③治療ワクチン (Fig. 4, Fig. 5)

感染したカニクイザルの系で HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + ヒト IL-12 DNA ワクチンを投与した。この群では 5 頭中 5 頭 100% の生存率が認められた。一方コントロール群の生食投与群では, 60% の生存率であっ

た。この DNA ワクチン投与群では, 体重増加が認められ, 末梢血 T 細胞の増殖増強反応が認められた。Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは最もヒトの結核感染症モデルに近いカニクイザルの系において予防ワクチンならびに治療ワクチン効果を示した。生存率・免疫能を増強した。したがってこのワクチンはヒト MDR-TB, XDR-TB の治療剤としてきわめて有用であることが示された。

## VI. おわりに

HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ エンベロープワクチンが優れていることより, このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日を夢見ている。厚生科研, 文部科研, 大阪結核予防会研究費等により支援を受けた。

## 文 献

- 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). 本の泉社, 東京, 2003, 150-161.
- Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 93-129.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine. 2007; 25: 2990-2993.
- Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. Vaccine. 2006; 24: 1191-1204.
- 岡田全司: The development of novel vaccines against tuberculosis. Jpn J Clin Immunol. 2008; 31: 356-368.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG

- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2132-2135.
- 7) 岡田全司：結核ワクチン。「結核」第4版、泉 孝英、網谷良一編、医学書院、東京、2006、50-58.
  - 8) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009 ; 27 : 3267-3270.
  - 9) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 ; 282 : 121-125.
  - 10) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al.: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1335-1343.
  - 11) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 ; 78 : 7718-7721.
  - 12) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al.: B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med*. 1983 ; 157 : 583-590.
  - 13) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al.: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol*. 1988 ; 141 : 1543-1549.
  - 14) Okada M, Kita Y: Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 2010 ; 6 : 1-12.
  - 15) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: *Procedia in Vaccinology*. Vol. 2, 3rd. Vaccine Global Congress, Singapore, 2009.
  - 16) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, et al.: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol*. 2004 ; 172 : 7618-7628.
  - 17) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 ; 10 : 1240-1244.

## Current Topics

ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNITY BY CYTOTOXIC T CELLS · GRANULYSIN  
AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL VACCINES  
(HSP-65 DNA + IL-12 DNA)

Masaji OKADA and Yoko KITA

**Abstract** CDC and ACET in U.S.A. reported that novel vaccines instead of BCG are required for the protection against infection of *Mycobacterium tuberculosis* worldwide. However, no novel vaccine for clinical use has not yet been developed in the world including U.S.A. and Europe.

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP65 + IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse compared to the BCG vaccine on the basis of C.F.U of number of TB, survival, an induction of the CD8 positive CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine also provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extremely drug resistant TB (XDR-TB) in murine models. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses. Furthermore, the BCG priming and HSP65 + IL-12/HVJ vaccine (booster)

by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy (100% survival) and augmentation of immune responses in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* including XDR-TB and MDR-TB for human therapeutic clinical trials.

The review also provides recent advances of the precise studies of induction of immunity including CD8 positive cytotoxic T cells and effector molecules such as granulysin by these vaccines, against multi-drug resistant tuberculosis and extremely drug resistant tuberculosis.

**Key words:** Killer T cell, Granulysin, New TB vaccine

Clinical Research Center, National Hospital Organization  
Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center,  
National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical  
Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-  
8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)

## ミニ特集「免疫と結核」

## 結核免疫(序論)

岡田 全司

**要旨:** いまだに世界の3分の1の20億人が結核菌に感染しており, その中から毎年940万人の結核患者が発症し, 180万人が死亡している, 最大の感染症の一つである(WHOレポート2008年)<sup>1)</sup>。本邦でも1998年から結核罹患率が増加・横ばいが認められ, 1999年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の抵抗性は細胞性免疫といって過言ではない。特に獲得免疫(キラーT細胞, Th1ヘルパーT細胞, Mφ)が重要であり, 最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。一方, DBA/1マウスやBALB/cマウスがC57BL/6マウスに比較して結核菌感受性であり, 特にDBA/1マウスはBALB/cマウスよりも結核菌易感受性であることも発見した。この結核菌抵抗性は各マウスストレインのキラーT細胞誘導活性と相関することを発見した。したがって, これらの「免疫と結核」の最先端の研究を行っている研究者に執筆をお願いした。(1)結核菌抗原認識とT細胞免疫, (2)CpGモチーフと結核免疫でTLR9によるCpG認識, (3)Lipocalin 2, SLPIと結核自然免疫, (4)キラーT細胞, granulysinによる結核免疫とワクチン(HSP 65+IL-12 DNA ワクチン等)開発, (5)結核に対する感染防御機構, をトピックとして選んだ。

**キーワード:** 結核免疫, T細胞, 獲得免疫, 自然免疫

## I. はじめに

結核症に対する免疫は宿主の抵抗性細胞性免疫といって過言ではない。特に獲得免疫(キラーT細胞とTh1ヘルパーT細胞)が重要であり, 最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。

また, マクロファージ(Mφ)が結核菌増殖の場であり, Mφ-T細胞間の相互の活性化, ヘルプにより結核感染防御に重要な抵抗性を示す。

したがって, これらの「免疫と結核」の最先端の研究を行っている研究者に執筆をお願いした。

## II. 結核症

## (1) 結核症の現状

結核症は最大の再興感染症で, HIV感染に伴う結核合併症や多剤耐性結核が大きな問題である。

2007年の本邦結核死亡率は10万人に1.7, 罹患率は10万人に19.8人である。日本の結核罹患率は, 欧米の約5

倍も高く, アジア(中国, インド等)やアフリカ地域に多い。

感染した人の5~10%の人が発病し, 発病は免れた人でも3分の1以上の人は結核菌をからだの中に抱えたまま高齢に達している。結核菌はからだの抵抗力(免疫力)によって抑え込まれ冬眠状態(dormancy)になっている。高齢, 糖尿病, エイズ, 副腎皮質ホルモンによる治療, 慢性腎不全(人工透析), 抗関節リウマチ薬の抗TNF $\alpha$ 抗体等で免疫力が低下すると, 冬眠していた結核菌が暴れ出す。

## III. 獲得免疫と結核

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4<sup>+</sup>T細胞, NK細胞,  $\gamma/\delta$ T細胞, キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>TとCD8<sup>-</sup>T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(Fig. 1)。また, 1998年*Nature*に結核菌H37Rvゲノム全塩基が掲載され, 遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった。

(1) キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)

すなわち、結核における CD8<sup>+</sup>T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (Fig. 2) (当ミニ特集・岡田, 喜多のキラー T細胞・granulysinによる結核免疫の項参照)。

MHCクラス I 拘束性の結核菌の 38 kDa 蛋白, HSP65 蛋白を認識するマウス CD8<sup>+</sup> キラー Tや 19 kDa 蛋白, Ag85, CFP10 (Mtb11) を認識するヒト CD8<sup>+</sup> キラー Tが報告されている<sup>10)</sup>。ESAT-6 抗原に対するキラー Tで HLA-A2 とは 82~90 位の 9 個のアミノ酸 AMASTEGNV が結合してキラー T細胞がこれらを認識する。われわれは世界に先駆けて確立した、ヒト生体内結核免疫応答解析モデル SCID-PBL/hu に、この ESAT-6 ペプチドを投与し、これに特異的で HLA-A2 拘束性を示すヒトキラー Tを生体内で誘導することに初めて成功した<sup>2)12)</sup>。

(2) ヘルパー T細胞

CD4<sup>+</sup>T細胞が結核免疫に重要であることは MHC Class II (-/-)マウスや CD4 (-/-)マウス, 抗 CD4 抗体投与マウスで明らかとなっている (Th1 と結核免疫につ

いては岡田総説<sup>1)</sup> 参照のこと)。

IV. 自然免疫と結核

(1) マクロファージ (Mφ)

結核菌の増殖場所は Mφ 内である。一方、Mφ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒト (生体) が優位に立つかの戦争でもある (詳細は岡田結核文献<sup>2)3)</sup> 参照)。殺菌性ラジカルである活性酸素, 各種殺菌蛋白 ROI や NO などの RNI, TACO, Nramp も結核菌の殺傷に関与する。

(2) Toll-like 受容体および Pathogen Recognition Receptor とマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見された Toll-like receptor (TLR) ファミリーが innate immunity の重要な役割を果たしている<sup>13)</sup>。

TLR (TLR1~TLR10) はそのリガンドによって大きく 3 つに分類される (Fig. 3A)。

このうち菌体膜由来の糖脂質を認識する TLR としては、TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 である。

結核菌の cell wall (LAM, mAGP, total lipid) による応答は TLR2 を介する (Fig. 3B)。一方、結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。病原株の *M. tuberculosis* 由来の Man LAM は Mφ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なる glycolipid Ara LAM よりなり、これは TLR2 を介して Mφ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分 19 kDa の lipoprotein が TLR2 を介して Mφ を活性化する。また、抗酸菌 DNA から見いだされた CpG モチーフ (パリンドローム配列) は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpG レセプターに対する TLR9 が審良らによりクローニングされた。

TLR2 の場合、細胞内領域の 2 つの変異 (Arg753 Gln と Arg677 Trp) が認められ、Arg753 Gln は敗血症にかか

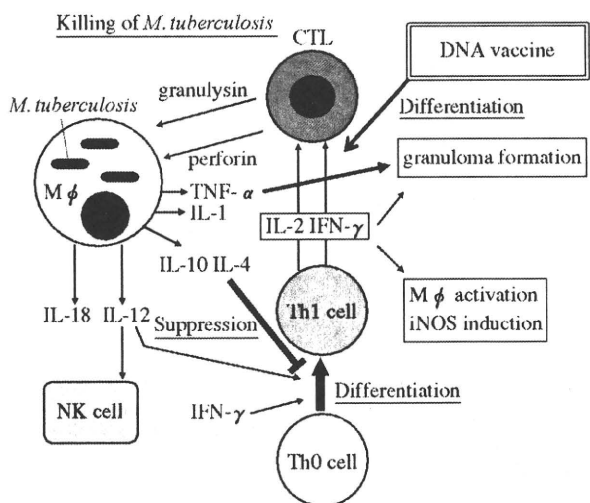


Fig. 1 Mφ and T cell immunity against tuberculosis

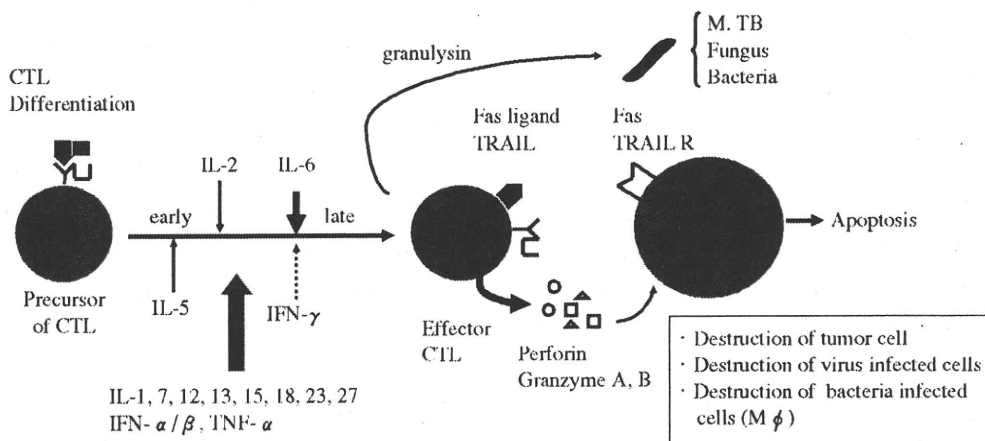


Fig. 2 Induction of CTL and granulysin

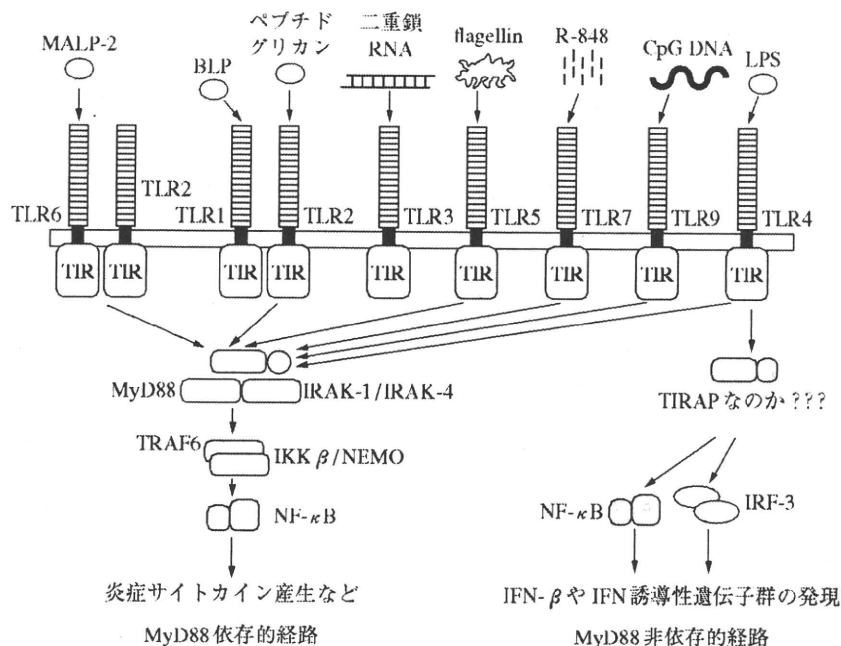


Fig. 3A TLR and pathogens

りやすく、Arg677 Trpはアジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

TLRはそれぞれ病原微生物由来の構成成分を認識する。TLRシグナルを介するシグナル伝達経路にはMyD88を介するMyD88依存経路とMyD88を介さないMyD88非依存経路の2つが存在する。主に前者はすべてのTLRを介した炎症性サイトカインの産生を、後者は主にTLR3・TLR4を介したインターフェロン(IFN)およびIFN誘導性遺伝子群の産生を担う。

このMyD88非依存経路を担うアダプター分子がTRIFである。TRIFがTLR3とTLR4のMyD88非依存経路に共有されているのに対し、TRAMはMyD88非依存(TRIF依存)経路をTLR4シグナルに特異的にだけ与えるアダプター分子である。また、TIRAPはすべてのTLRに共有されたMyD88依存経路を、TLR1/2/6とTLR4シグナル特異的に与える役割をもつ。われわれは竹田との共同研究でTRIF(-/-)×MyD88(-/-)ダブルノックアウトマウスを用い、結核菌に対する易感染性を解析しつつある。

TLR以外にもPRR(pathogen recognition receptor)としてDC-SIGN, NODファミリー, マンノース受容体, スカベンジャー受容体, dectin-1があげられる。HIVや*M. tuberculosis*はDC-SIGNに結合して樹状細胞に入り込むが、その際、そのTLRによる自然免疫機構の活性化を抑制し、これらの病原体の生存を有利にする機構が働いていることが示された。NOD1, NOD2を中心とするCARDファミリーの分子は、膜貫通領域をもたず、細胞

Fig. 3B TLRと結核菌体成分

結核菌体成分	レセプター
LAM	TLR2
CWS	TLR2/4
peptidoglycan	TLR2/4
19 kDa lipoprotein	TLR2
CpG repeat	TLR9

質蛋白として存在する。NOD2は、古くより菌体由来の免疫調整物質として知られていたPGNの構成成分であるムラミルジペプチド(MDP)を認識することが示された<sup>9)</sup>。

(3) RNAヘリケース(RIG-I, MDA5, LGP1)

TLR-3, -4, -7はそれぞれウイルス核酸成分である二本鎖RNA, 一本鎖RNA, 非メチル化DNAなどのウイルス構成成分を認識しI型IFN産生を誘導する。TLRはウイルスセンサーであると考えられている。一方、細胞内に存在するRNAヘリケースRIG-I(retinoic acid inducible gene 1)およびMDA5(melanoma differentiation associated gene 5)は、細胞内に侵入したウイルスを感知するシステムであり、ウイルスに特徴的な二本鎖RNAや一本鎖RNAの5'-triphosphate構造などを認識し、I型IFN産生を誘導する<sup>10)</sup>。

(4) 細胞内ウイルスセンサー～RNAヘリケース(RIG-I, MDA5, LGP2)

RIG-Iはレチノイン酸で誘導されるDEXD/boxRNAヘリケースであるが、ウイルス認識にかかわる分子として

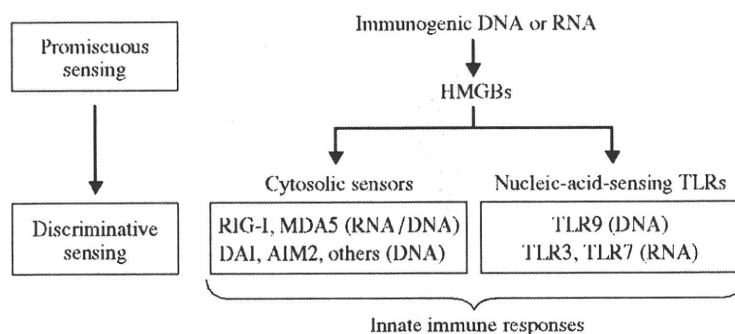


Fig. 3C Intracellular DNA sensor

発見された<sup>14</sup>。細胞質に存在する RIG-I は、C 末のヘリケースドメインでウイルスの複製過程でできる二本鎖 RNA を認識し、N 末に存在する 2 つの CARD ドメインから IFN 誘導シグナルを下流へと伝達すると考えられている。MDA5 は RIG-I 同様、N 末に 2 つの CARD および C 末にヘリケースドメインをもつ分子で、RIG-I と相補的にウイルス認識に関与することが報告されている。今のところ人工二本鎖 RNA である polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C) が MDA5 のリガンドとして同定されている。LPG2 は負の制御を行う。HVJ-エンベロープベクターはこの RIG-I をより刺激する可能性が示唆されている (Fig. 3C)。

(5) 細胞内 DNA センサー DAI, AIM2, High Mobility Group Box (HMGB)

細胞内 DNA センサーとして、DAI (DNA-dependent activator of IRFs) と AIM2 (absent in melanoma 2) が発見され、自然免疫と獲得免疫を誘発する。また、RLRs (RIG-I like receptor) も細胞内 DNA センサーとして作用する。

HMGB タンパク質でできる HMGB1, HMGB2 および HMGB3 が核酸の万能監視役として機能することが示された。HMGB が存在しないと、核酸による TLR3, TLR7, TLR9 の活性化も低下する。HMGB は乱雑な核酸センサーであり、TLR3, 7, 9, RIG-I, MDA5, DAI, AIM2 は細かい識別力のある核酸センサーである。DNA ワクチンが強力な免疫活性を示すのがこの経路と関与するかどうか興味深い (Fig. 3C)<sup>15</sup>。

(6) 樹状細胞

ウイルス感染時において、免疫担当細胞の 1 つである樹状細胞 dendritic cell (DC) は大量の I 型 IFN を産生することが知られている。さらに、DC の中でもプラズマサイトイド DC (pDC) とよばれる集団が特に IFN- $\alpha$  産生能が高いことが明らかとなってきた。DC はこの pDC とそれ以外のコンベンショナル DC (cDC) の 2 つのサブセットに大きく分けることができる。cDC は GM-CSF 存在下に骨髓細胞より誘導することができる。pDC は

Flt-3-L により骨髓細胞から誘導することができ、TLR7, TLR9 を高発現しているという特徴をもつ。

## V. 結核菌抵抗性と宿主免疫

(1) マウスの系統と結核菌抵抗性

結核菌に対する感染性抵抗性はマウスの系統により大きく異なる。結核実験によく使われる C57BL/6 マウスは結核菌抵抗性である。一方 BALB/c マウスは結核菌感受性であることはよく知られた事実である。その理由として、C57BL/6 は I 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 優位のマウスであり、BALB/c マウスは II 型ヘルパー T (Th2) 優位のマウスであることがあげられる。C57BL/6 マウスの Th1 機能は BALB/c マウスの Th1 機能の 200 倍であると報告されている。

われわれは種々の系統のマウスのキラー T 細胞誘導機能と結核菌感染抵抗性が相関する結果を最近得たので報告する。特に DBA/1 マウスは BALB/c マウスよりも強い結核菌感受性を発見したので、その実験結果を報告する (Fig. 4, 5, 6)。

DBA/1 マウス脾細胞, BALB/c マウス脾細胞, および C57BL/6 脾細胞をそれぞれ PPD 5  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 結核死菌 H37Ra 20  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml で刺激して *in vitro* 培養し、5 日後の結核菌抗原 HSP65 に対するキラー T 細胞活性を <sup>51</sup>Cr 遊離法で測定した。

その結果、DBA/1 マウスと BALB/c マウス脾細胞中のキラー T 活性は C57BL/6 脾細胞中のキラー T 活性に比較して著明に低下していた (Fig. 5A)。さらに、メモリーキラー T 細胞活性の系では、BALB/c マウス由来のメモリーキラー T 誘導は認められたのに比較し、DBA/1 マウス由来のメモリーキラー T 細胞誘導はほとんど認められなかった (Fig. 4)。一方 IFN- $\gamma$  産生においては、DBA/1 マウスの脾細胞のほうが、BALB/c よりも IFN- $\gamma$  産生増強が強いことが示された (Fig. 6)。IL-2 産生においては BALB/c が最も低く、C57BL/6 よりやや低下するものの、DBA/1 は強い産生が認められた。これら

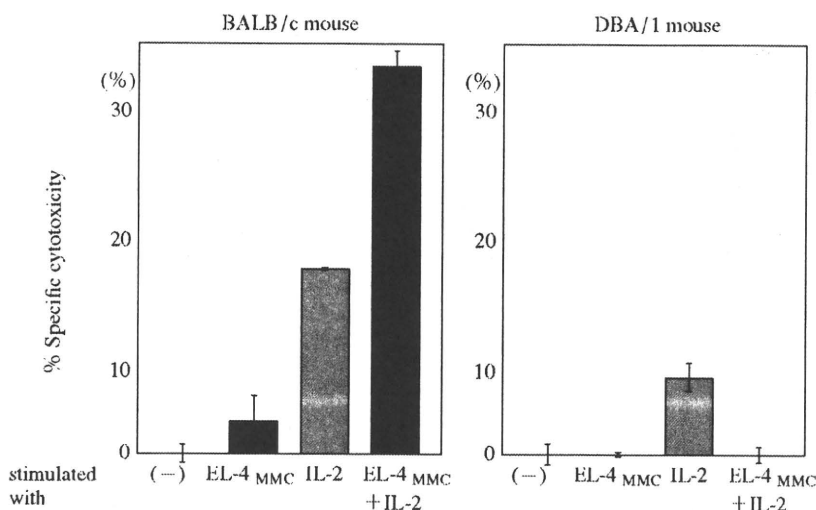


Fig. 4 Comparison of CTL induction *in vitro* against *M. tuberculosis* antigens between DBA/1 mouse and BALB/c mouse (Target EL-4)

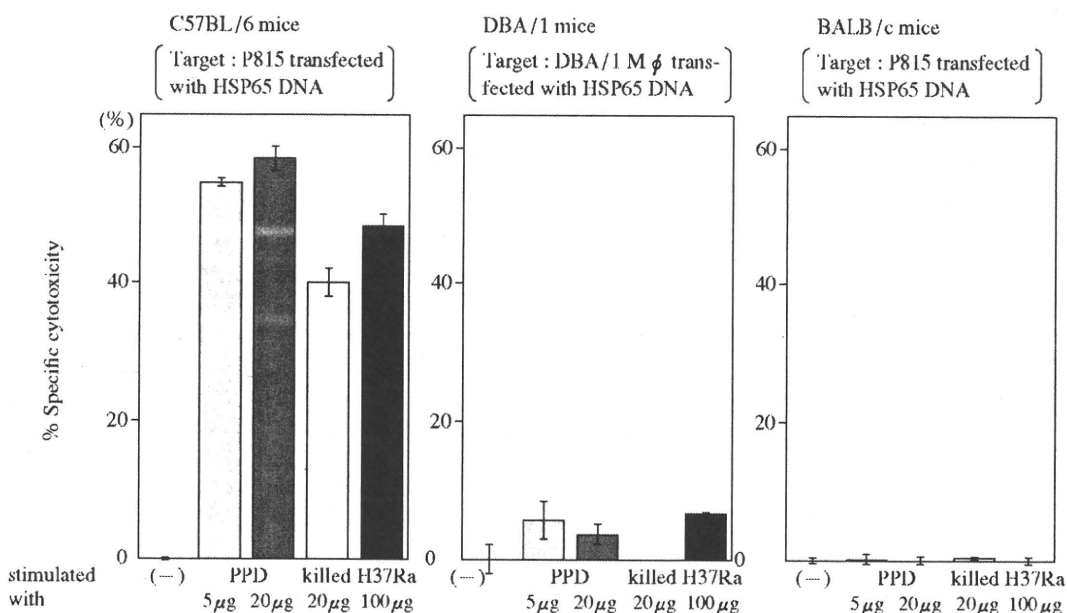


Fig. 5A Comparison of CTL induction *in vitro* against *M. tuberculosis* antigens among DBA/1, BALB/c and C57BL/6 mice

の結果より、結核菌抵抗性とキラー T細胞活性が最も相関することを明らかにした (Fig. 5B)。

### V. サイトカインと結核

(1) キラー T細胞分化とサイトカイン (キラー T細胞分化因子)

筆者らは CD8<sup>+</sup> キラー T細胞 (Tc) の誘導にはヘルパー T細胞 (Th細胞) から産生されるサイトカインが必要であることをはじめて明らかにした。クラス II 抗原を認識しキラー T細胞分化因子を産生する Th細胞は CD4<sup>+</sup> CD

8<sup>-</sup>であり、クラス I 抗原を認識しキラー T細胞分化因子を産生する T細胞は CD8<sup>+</sup>である。また、モノクローナル抗 IL-2 抗体を用いて、IL-2 はキラー T細胞誘導に必要な因子の一つであることを示した (Fig. 2)<sup>16)~18)</sup>。

さらに、IL-2とは異なるサイトカインも T細胞分化誘導に必要なことをキラー T細胞分化因子を産生するヒト T細胞ハイブリドーマ、および IL-2 依存性ヒト Th クローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6、IFN- $\gamma$  がキラー T細胞分化因子として強力なキラー T分化を誘導することを明らかにした<sup>15) 16)</sup>。



Fig. 5B mouse strainと結核菌感受性

マウス strain	結核菌感受性免疫能			
	結核菌感受性	結核菌 $5 \times 10^5$ i.v. 後生存菌数	メモリーキラー T誘導	IFN- $\gamma$ 産生能
C57BL/6	+	>300日	++++	++++
BALB/c	++	250日	+	+
DBA/1	++++	25日	-	+++

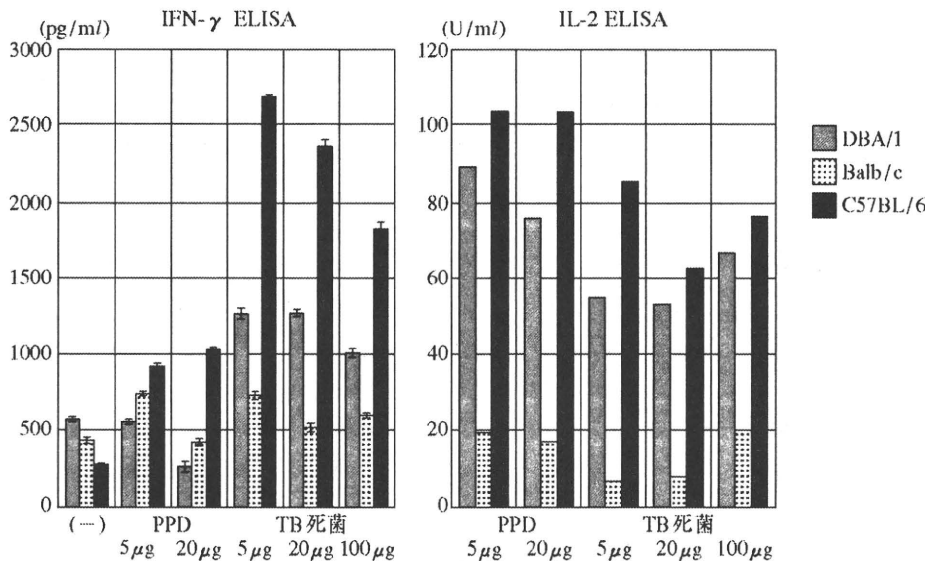


Fig. 6 IFN- $\gamma$  and IL-2 productions from DBA/1, Balb/c or C57BL/6 mouse spleen cells

筆者らは IL-6 が Tc 誘導の後期の分化段階に作用することを解明した<sup>16)</sup>。多剤耐性結核患者 PBL において、これらのキラー T 細胞分化因子すなわち IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 の著明な低下を認めた<sup>8)</sup>。また、糖尿病合併難治性結核患者では PPD 特異的キラー T の分化誘導の著しい低下を明らかにした<sup>8)</sup>。

(2) サイトカインと結核免疫

細胞内寄生細胞（とくに結核菌）は M $\phi$  に貪食されても殺菌処理されず、細胞内増殖が可能な菌である。種々の機構で M $\phi$  の殺菌から逃れ、結果的に慢性持続性炎症（慢性感染症）および肉芽腫形成を誘発する。抗結核菌免疫に IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 が重要であることは解析されている。

(3) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15 と結核免疫

細菌の貪食に伴って M $\phi$  が産生するサイトカインのうち、IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  や IL-1 は、T 細胞, NK 細胞および  $\gamma\delta$  型 T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生誘導に関与している。IFN- $\gamma$  は、M $\phi$  を活性化し貪食した菌の殺菌処理を促進するヘルパー T 細胞, キラー T 細胞の分化因子としても作用する。IL-12 と IFN- $\gamma$  産生の間にはポジティブフィードバック機構が働いて IFN- $\gamma$  は M $\phi$  からの

IL-12 産生を誘導し、IL-12 は T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生をさらに増幅し、初期防御反応では感染局所に M $\phi$  を集め、特異的防御免疫が成立する<sup>3)</sup>。

IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  は  $\alpha\beta$  型 T 細胞の Th1 への分化に重要なサイトカインで、IL-6 や TNF- $\alpha$  と強調して抗原特異的な Th1 を誘導する。Th1 の分化誘導には樹状細胞 (dendritic cells: DC) が重要で、M $\phi$  よりも高い T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生誘導活性を示す。DC が末梢リンパ組織に移行して感染抵抗性 T 細胞の分化を誘導する。ファゴソーム内で処理された細菌由来の抗原は class II 分子に結合し CD4<sup>+</sup> Th1 型 T 細胞により認識される。細胞質に存在する細菌由来抗原はプロテオソームにより分解され class I 分子と会合し、CD8<sup>+</sup> T 細胞により認識される。CD8<sup>+</sup> T 細胞は IFN- $\gamma$  を産生するとともに、殺菌能の低下した M $\phi$  や菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、あらたに動員されてくる活性化 M $\phi$  に菌を処理させ、感染防御に関与している。また、IL-15 はメモリーキラー T 細胞を活性化して結核免疫に寄与する。一方、IL-10 は結核免疫の M $\phi$  機能を抑制する。そのほか IL-10, ファミリーサイトカインとして IL-19, IL-22, IL-28, IL-29 が報告されているが、IL-10 と同様の機能

をもつのか、または、IL-28, IL-29はIFN- $\gamma$ とホモロジーがあり、抗ウイルス活性をもつことよりもIL-10と逆の結核免疫機能を示すか興味がある。IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4も結核に対する免疫応答を抑制する。IL-25は、IL-4, IL-5, IL-13の産生を誘導する。

結核性肉芽腫の形成にTNF- $\alpha$ の存在が最も重要である。

#### (4) IL-23, IL-27, IL-31, IL-32と結核免疫

IL-7, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-31はキラーT分化を誘導した。一方、DNAワクチン(HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン)は、特にIL-32(結核菌刺激特異的に産生。Plos Path 2006)と強いキラーT分化相乗効果を示した。

#### (5) ヒトサイトカイン産生異常症およびサイトカインレセプター異常と結核感染

ヒトにおいて、IFN- $\gamma$ 受容体遺伝子に変異がみられた先天性IFN- $\gamma$ レセプター欠損児に、BCGワクチン注射で重症全身性感染が認められたり、*M. avium*感染症をきたした。マウスにおいてもIFN- $\gamma$ 遺伝子ノックアウトマウスやIFN- $\gamma$ 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感染性である。

TNF- $\alpha$ は肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり、抗TNF- $\alpha$ 抗体投与マウスや、TNFレセプター(TNF-Rp55)欠失マウス、TNF $^{-/-}$ マウスでは結核菌感染の死亡率が著増し、肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した。さらに、IL-6遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪をきたしたりIFN- $\gamma$ の産生誘導の欠損がみられ、IL-6も非特異的防御、とくにM $\phi$ の活性化やキラーT細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある。著者らは世界に先駆けてIL-6産生能欠損患者IL-6 $^{-/-}$ 患者を発見した。この患者は易感染性で肺炎を繰り返し発症した。興味深いことに肺炎感染時CRP陰性で発熱も認められなかった。

IL-12レセプター欠損マウスやIL-12欠損患者では結核菌感染・増殖を抑制できなかった。すなわち、IL-12も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された。また、rIL-12の投与にてBALB/cマウスの結核菌抵抗性が増し、IL-12の生体内中和で感染増悪をきたす。IL-12p40とIL-12R $\beta$ 1欠損患者ではIL-12とホモロジーのあるIL-23やIL-23R欠損を伴うことが多い。IL-12欠損、IL-12R欠損患者の易結核菌感染性がIL-23 $^{-/-}$ に起因する可能性がある。

#### (6) サイトカインと結核治療

①マウスの系において、著者らはアデノウイルスベクターにIL-6関連遺伝子(IL-6 DNA+IL-6レセプターDNA+gp130 DNA)を導入し、結核感染治療効果を世界

に先駆けて明らかにした(いままで治療効果を示す治療ワクチンの報告はない)。結核菌に特異的キラーT細胞誘導活性、IL-2産生増強と関連した(IFN- $\gamma$  DNAも治療ワクチン効果)。

②Condosらは多剤耐性結核の5症例に対して、IFN- $\gamma$ の吸入治療を試みた。5例中4例で喀痰塗抹で菌陰性化した。しかし、治療中止1カ月後より再度陽性となった。また、胸部CTでは1例で有意な改善、1例で軽度改善、3例で空洞の縮小が観察された。

③肺結核患者に、IL-12投与を行い有効例が報告されている。

④サイトカインIFN- $\gamma$ , IL-2, IFN- $\alpha$ やG-CSFを多剤耐性結核患者に投与し、投与期間中のみ排菌数が減少した。

#### (7) 肉芽腫形成とサイトカイン

結核性肉芽腫の形成にTNF- $\alpha$ の存在が最も重要である。近年新しい抗リウマチ薬としてモノクローナル抗TNF- $\alpha$ 抗体がRAに有効であるが、多数の結核患者が発症することが報告されている。MCP-1やRANTESも肉芽腫形成に関与する。

## Ⅶ. おわりに

最近の獲得免疫と結核、自然免疫と結核、サイトカインと結核についてレビューした。Th17やregulatory T等については各論を参照されたい。

## 文 献

- 岡田全司:結核ワクチン.「結核」第4版,医学書院,東京,2006,50-58.
- 岡田全司:自然・獲得免疫と疾患:結核.最新医学.2005;60:678-696.
- 岡田全司:医学のあゆみ「サイトカイン」state of arts,医歯薬出版,東京,2004,209-213.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009; 27: 3267-3270.
- Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*. 2006; 24: 1191-1204.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007; 25: 2990-2993.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005; 23: 2132-2135.
- Okada M, Kita Y: Tuberculosis vaccine development: The

- development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 2010 ; 6 : 1-12.
- 9) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. *Procedia in Vaccinology*. 2010 ; 2 : 34-39.
- 10) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001 ; 19 : 93-129.
- 11) Schluger NW, Rom WN : The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 ; 157 : 679-691.
- 12) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al.: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the in vivo transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1335-1343.
- 13) Akira S : Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol*. 2001 ; 78 : 1-56.
- 14) 加藤博巳, 審良静男 : RNAウイルス認識におけるMDA5とRIG-Iへの役割. [Annual Review免疫]. 中外医学社, 東京, 2008, 57-60.
- 15) Yanai H, Ban T, Wang Z, et al. : HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009 ; 462 : 99-103.
- 16) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al. : Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 ; 78 : 7718-7721.
- 17) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al. : B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med*. 1983 ; 157 : 583-590.
- 18) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al. : IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol*. 1988 ; 141 : 1543-1549.

#### Current Topics

### IMMUNITY AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (INTRODUCTION)

Masaji OKADA

**Abstract** A third of world's population infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and 2 million people die from tuberculosis every year. It is well established that protective to *M. tuberculosis* depends on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells<sup>1)-8)</sup>.

In particular, acquired immunity (cytotoxic T cell, Th1 helper T cell and M $\phi$ ) play an important role for TB infection. Recently, natural immunity also play a very attractive role for the development of TB immunity.

We found that memory CTL is most important for the protection against TB using several kinds of mice. It was demonstrated that DBA/1 mice are more sensitive to TB infection than BALB/c mice (Th2 prone mice). Induction of memory CTL in DBA/1 mice was lower than BALB/c. In contrast, IFN- $\gamma$  production of DBA/1 mice was higher than BALB/c.

Therefore, famous researchers in the fields of TB immunity reviewed the recent advances of TB immunity, such as (1) T cell immunity and recognition against TB antigen, (2) TLR9

and CpG motif, (3) lipocalin2 and SLPI in natural TB immunity, (4) acquired immunity (CTL) and granulysin. The development novel vaccine (HSP65+IL-12 DNA vaccine), (5) The mechanism of protection against TB, in this mini-review series.

**Key words:** Immunity against M. TB, T cell, Acquired immunity, Innate immunity

Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)

## Phylogeographical particularity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries

Hee Yoon Kang,<sup>1</sup> Takayuki Wada,<sup>2</sup> Tomotada Iwamoto,<sup>3</sup> Shinji Maeda,<sup>4</sup> Yoshiro Murase,<sup>4</sup> Seiya Kato,<sup>4</sup> Hee Jin Kim<sup>1</sup> and Young Kil Park<sup>1</sup>

### Correspondence

Young Kil Park  
ypark7@empal.com

<sup>1</sup>Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, Kobe, Japan

<sup>4</sup>Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, Japan

To understand the domestic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the Republic of Korea, we genotypically analysed 80 isolates obtained from various geographical origins in the country. Of these, 64 (80.0%) isolates were identified as Beijing family strains. It is particularly interesting that their phylogenetic classification, based on the ancient/modern separation and the presence/absence of the genomic region RD181, revealed a majority of the ancient (RD181+) subfamily in the population. The 15 loci of variable number of tandem repeat(s) of mycobacterial interspersed repetitive units (15-MIRU-VNTR) were also analysed. Combination with the previous VNTR data reported from surrounding countries revealed that the topology of the minimum spanning tree was linked tightly not to the geographical origins of the patients but to the phylogenetic characteristics of the isolates. These results show that the phylogeographical distribution of the *M. tuberculosis* Beijing family around far-eastern Asia could be estimated using international accumulation and comparison of VNTR genotyping data.

Received 13 May 2010  
Accepted 20 June 2010

## INTRODUCTION

The Beijing family, a lineage of *Mycobacterium tuberculosis*, is well known for its highly endemic prevalence around East Asian countries and as a causative agent of tuberculosis (TB) (van Soolingen *et al.*, 1995). In the Republic of Korea (South Korea), TB is still a major public health concern, with 34 157 (70.3 per 100 000) registered new TB patients in 2008 and 2376 deaths attributable to TB in 2007 (Korea Centers for Disease Control & Prevention, 2008). More than 70% of *M. tuberculosis* strains isolated from Korean pulmonary TB patients belong to the Beijing family. 'K strain' (Park *et al.*, 2000), one of the Beijing family strains, has been reported as the cause of a severe outbreak of TB in South Korea (Kim *et al.*, 2001). Although their phylogenetic position in the Beijing family

lineage has been unclear, Shamputa *et al.* (2010) reported recently that K strains show genetic diversity by some genotyping methods, even in isolates obtained from a single hospital.

The detailed phylogenetic variation of the Beijing family has been unveiled by various genetic markers such as single nucleotide polymorphisms, regions of difference and variable number of tandem repeat (VNTR) loci (Filliol *et al.*, 2006; Tsolaki *et al.*, 2005; Wada & Iwamoto, 2009). A notable characteristic of the lineage is the insertion of IS6110 in a genomic region named NTF (Mokrousov *et al.*, 2005; Plikaytis *et al.*, 1994). This phylogenetic marker can classify the Beijing family into two distinct sublineages: ancient and modern. The modern Beijing sublineage has been more predominant than the ancient sublineage throughout the world, including countries surrounding South Korea (Bifani *et al.*, 2002; Dou *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2009; Mokrousov *et al.*, 2005, 2006; van Soolingen & Kremer, 2009). However, Wada *et al.* (2009) reported that the ancient Beijing sublineage has been observed to be exceptionally predominant in Japan.

**Abbreviations:** MIRU-VNTR, variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units; MST, minimum spanning tree; TB, tuberculosis.

Supplementary tables giving information on and genotypic profiles of the isolates analysed in this study are available with the online version of this paper.

The goal of this study was to elucidate the phylogenetic distinctiveness and the genetic diversity of Beijing family strains around the Republic of Korea, including K family strains, for international comparison with strains from surrounding countries. For this purpose, we analysed a collection of *M. tuberculosis* isolates obtained from public health centres in the country using well-known phylogenetic markers and an international standard set of VNTR loci (Supply *et al.*, 2006).

**METHODS**

**Bacterial isolates.** Eighty *M. tuberculosis* clinical isolates were analysed in this study. They were randomly selected from smear-positive and culture-positive pulmonary TB patients who were under 46 years of age with no epidemiological links during 2006. All patients were primary cases. Information such as geographical origin, age and sex of the patients, date of isolation and drug susceptibility for each of the 80 isolates is presented in Supplementary Table S1 in JMM Online. The geographical distribution of the population is presented in Fig. 1.

**Identification of Beijing family strains and their phylogenetic subdivision.** The Beijing family strains were defined by the deletion of RD207 in this study (Tsolaki *et al.*, 2004). The deletion of RD207

corresponds with the absence of signals 1–34 in spacer oligonucleotide (spoligo) genotyping, which is the most standard definition of the lineage (van Soolingen *et al.*, 1995). The presence or absence of RD207 was analysed using PCR according to a previous report (Warren *et al.*, 2004).

The classification of the ancient and modern subfamilies of the 64 Beijing family isolates was determined according to a previous report (Wada *et al.*, 2009). The presence or absence of RD181 was also verified as described previously (Tsolaki *et al.*, 2004). The genomic deletion of RD181 has been considered to have occurred during evolution of the ancient Beijing sublineage (Tsolaki *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2010). The sets of primer sequences were described in these previous reports. They were designed to detect insertions or deletions of regions by the difference in sizes of amplified DNA fragments.

**IS6110 DNA fingerprinting.** For all 80 isolates, DNA isolation and IS6110 RFLP typing were performed as described previously (Park *et al.*, 2000). The IS6110 RFLP patterns were compared with UPGMA using the Dice coefficient to find RFLP clusters (GelCompar v. 5.1; Applied Maths). An RFLP cluster was defined by the identification of two or more isolates with identical band patterns. K family strains were identified according to the previously reported definition (Kim *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2000).

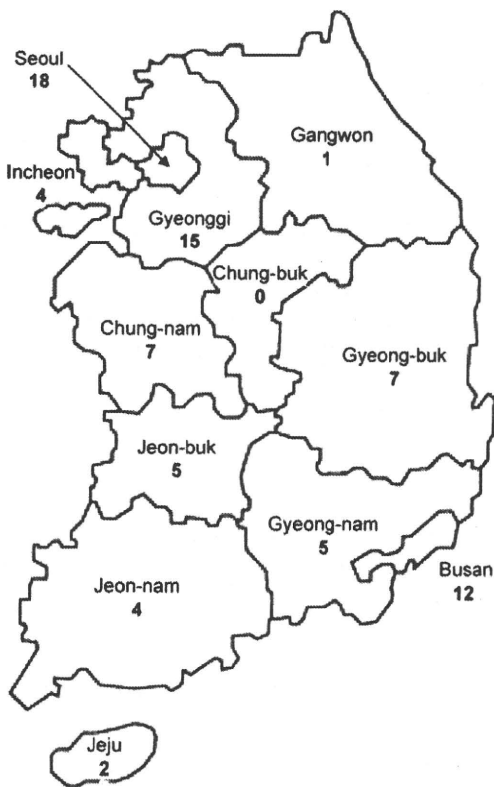
**VNTRs.** The standard 15 VNTR loci for routine epidemiological discrimination (hereinafter, 15-MIRU-VNTR) were also analysed for all 80 isolates (Supply *et al.*, 2006). Their copy number was calculated from their size and assigned according to the number of repeats for each locus, and in agreement with published allelic tables (Iwamoto *et al.*, 2007). The accuracy of the size of amplified PCR fragments was confirmed using a capillary electrophoresis system (SV1210; Hitachi High Technologies). A VNTR cluster was defined by the identification of all 15 loci in two or more isolates.

**Minimum spanning tree (MST).** A MST was generated based on the 15-MIRU-VNTR types using software (Bionumerics v. 4.6; Applied Maths) for clustering analysis. We used the reconstruction rules as follows. A categorical coefficient was selected. The priority rule was set such that the type that had the highest number of single-locus variants would be linked first. Creation of hypothetical types was not allowed. The VNTR types of Beijing family strains from neighbouring countries were retrieved from previous reports (Jiao *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2009). All 15-MIRU-VNTR types published in these reports were incorporated into the construction of the MST tree.

**RESULTS**

**Phylogeographical specificity of the Beijing family in South Korea**

To elucidate the population structure of *M. tuberculosis* in South Korea, we identified 64 (80.0%) Beijing family strains from 80 isolates obtained from various geographical origins (Fig. 1) and subdivided them into three phylogenetic sublineages [ancient (RD181+), ancient (RD181-) and modern]. A high proportion of the lineage is concordant with previous reports from South Korea and surrounding East Asian countries (Mokrousov *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2000, 2005; van Soolingen *et al.*, 1995; Yun *et al.*, 2009). Phylogenetic subdivision of the 64 Beijing isolates revealed a higher proportion of the ancient Beijing sublineage (46 strains; 71.9%) than the modern sublineage



**Fig. 1.** Nationwide distribution of the *M. tuberculosis* strains used for this study. The 80 *M. tuberculosis* isolates were obtained from new pulmonary TB patients registered in public health centres across South Korea in 2006.



(18 strains; 28.1%). The ancient (RD181+) sublineage, having diverged from the evolutionary process towards the modern Beijing sublineage before the deletion of RD181, was observed to be predominant (29 strains; 45.3% of the Beijing strains) in the population. This study identified 13 K family strains (16.3% of all; Fig. 2): all were found to belong to the ancient (RD181+) sublineage.

### Genotypic diversity of isolates in South Korea

We analysed all 80 isolates by 15-MIRU-VNTR to investigate the detailed genotypic diversity of the population. This genotyping method has been used as a standard discrimination tool for *M. tuberculosis* because of its high resolution among isolates from cosmopolitan origins (Supply *et al.*, 2006). The VNTR profiles and other genotypic characteristics analysed in this study are combined and listed in Supplementary Table S2. The genotyping was able to classify our 80 isolates into 71 distinct genotypes. There were four clusters, which comprised 16 (20.0%) isolates. The clustering rate was slightly higher than that of RFLP genotyping (10 isolates; 12.5%), which was concordant with the previous reports on the Beijing family (Iwamoto *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2007). Six of 13 K family strains belonging to two RFLP clusters were separated further into unique genotypes using 15-MIRU-VNTR (Fig. 3).

Recently, it was reported that cluster modelling of 15-MIRU-VNTR genotypes of the *M. tuberculosis* Beijing strains was highly concordant with their phylogenetic subdivision into some sublineages (Wada & Iwamoto, 2009). MST clustering analysis was performed for the 64 Beijing strains of our population (Fig. 4). The tree topology

was observed to be highly associated with the sublineage classification.

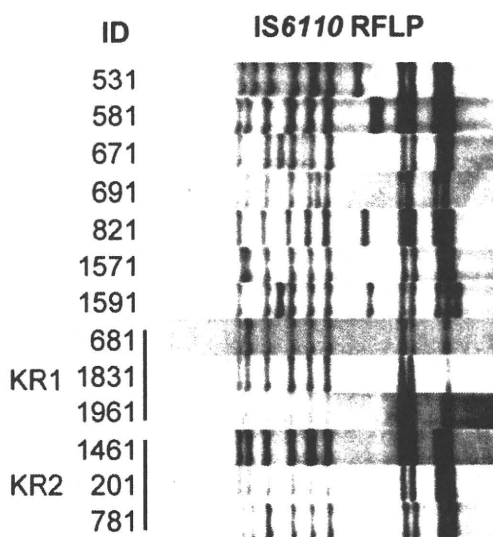
### Comparison of VNTR profiles with those of neighbouring countries

The MST clustering of 15-MIRU-VNTR genotypes was sufficient to visualize the phylogenetic differences among the Beijing family successfully in our study (Fig. 4), which prompted us to make an international comparison of the 15-MIRU-VNTR types with those of strains from the neighbouring countries (China and Japan) reported previously. The 202 15-MIRU-VNTR types of Beijing strains from Japan (Wada *et al.*, 2009) and the 64 types from Beijing City, China (Jiao *et al.*, 2008), were combined with our current data to construct a mixed clustering tree using MST (Fig. 5). Results showed that three branches including types of strains from South Korea were readily apparent, two of which included mostly South Korean types (indicated by arrowheads). Both these branches comprised strains belonging to the ancient (RD181+) sublineage, isolated in Japan and South Korea. A remaining branch included types from all three countries (indicated by an arrow). The results of the ancient/modern classification in the previous report by Wada *et al.* (2009) and this study showed that this branch was occupied by modern Beijing strains.

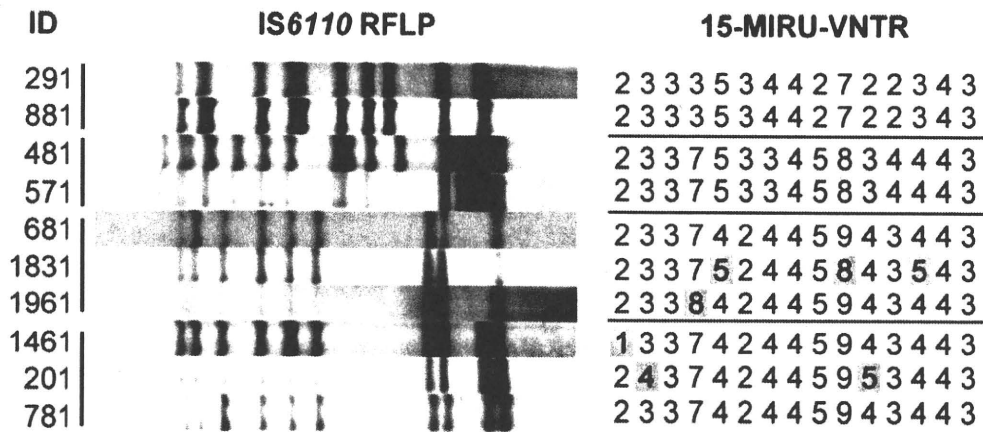
## DISCUSSION

In general, the ancient Beijing sublineage has been considered to be an atypical Beijing genotype which has been only rarely observed (Bifani *et al.*, 2002; Milan *et al.*, 2004; Strauss *et al.*, 2008). The sole exception has been the population study of Beijing family strains from Japan (Wada *et al.*, 2009). In this study, we found that the ancient sublineage was predominant in South Korea. Contrary to the situation in Japan, it is unique that the ancient (RD181+) sublineage was the most prevalent in our 80 isolates. This sublineage has been reported to be a minor component of the Beijing family population, even in Japan (Maeda *et al.*, 2010). Therefore, our data also revealed the particularity of the population structure of the *M. tuberculosis* Beijing family in South Korea. These observations suggest that the distribution of the Beijing family sublineages is broadly variable in different regions. It still remains unclear whether the higher prevalence of the sublineages in certain areas has been caused by the difference of fitness or by occasional clonal expansion in the past.

K family strains, derivatives of the Beijing family, have been isolated frequently in both a population-based study and outbreaks of TB in South Korea (Kim *et al.*, 2001; Shamputa *et al.*, 2010). In this study, they were also detected with a high clustering rate (46.2%) using RFLP genotyping (Fig. 2) despite no epidemiological link. They belonged to the ancient (RD181+) sublineage. Therefore,



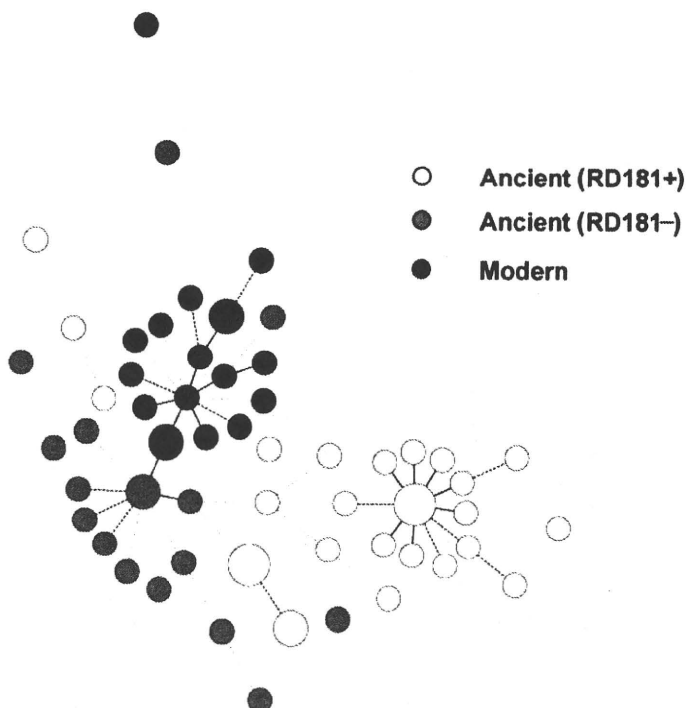
**Fig. 2.** IS6110 RFLP patterns of the K family isolates identified in this study. Two clusters were detected in these 13 isolates (KR1, 681, 1831 and 1961; KR2, 1461, 201 and 781).



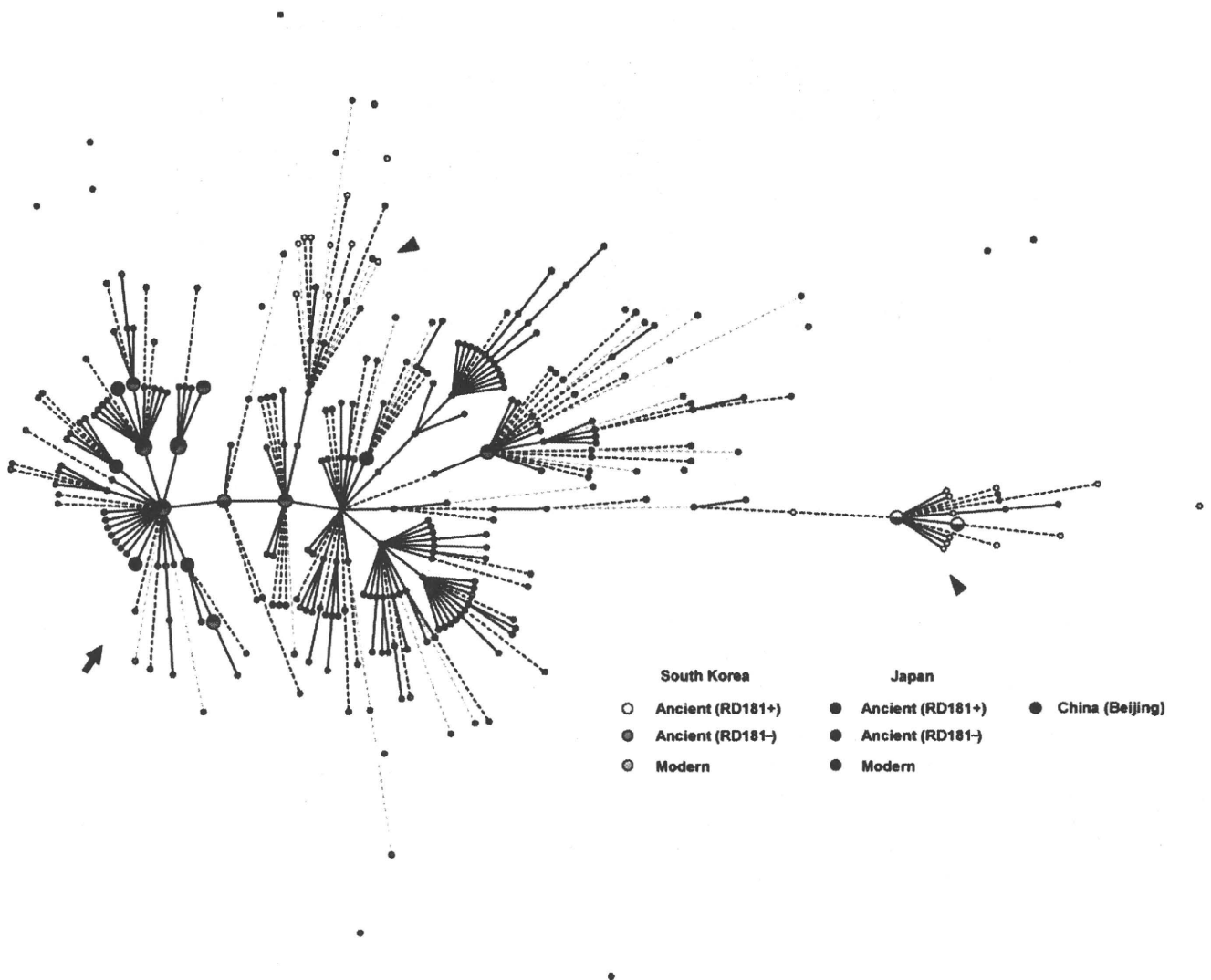
**Fig. 3.** 15-MIRU-VNTR profiles of 10 isolates belonging to four clusters by IS6110 RFLP genotyping. The order of the VNTR loci is: MIRU 04, MIRU 10, MIRU 16, MIRU 26, MIRU 31, MIRU 40, ETR A, ETR C, QUB-2163b, QUB-26, QUB-4156, Mtub04, Mtub21, Mtub30 and Mtub39. The alleles that differed from those of other isolates in the respective clusters are shaded.

the domestic prevalence of K family strains may be related to the predominance of the sublineage in the country. The 15-MIRU-VNTR genotyping was able to classify the RFLP clusters as single-locus to three-locus variants comprising the K family strains (Fig. 3). This result suggests that frequent isolation of K family strains in South Korea may be caused not by a recent expansion of a single strain but by endemic fixation in the past. The genetic diversity within the K family strains should be analysed in more detail to uncover the history of their prevalence.

Combining our data with the reported VNTR types of strains from the surrounding countries for MST clustering analysis revealed that the tree topology (the branch formation) was consistent with the phylogenetic classification of strains, irrespective of their origins (Fig. 5). The types of strains originating in China (Beijing) reported by Jiao *et al.* (2008) were concentrated in the branch of the modern Beijing sublineage of South Korea and Japan. Although their data did not include information on sublineages of strains, the result is consistent with those



**Fig. 4.** Minimum spanning tree based on the 15-MIRU-VNTR genotypes of the 64 *M. tuberculosis* Beijing isolates. The 56 circles depicted correspond to the different types discriminated by the 15-MIRU-VNTR genotyping. Their sizes correspond to the number of isolates with a particular genotype. They were coloured according to the phylogenetic sublineages: ancient (RD181+), ancient (RD181-) and modern. Heavy lines connecting two types denote single-locus variants; thin lines connect double-locus variants; and dotted lines (black) connect triple-locus variants. The grey dotted lines represent the most likely connection between two types differing by more than three VNTR loci.



**Fig. 5.** Minimum spanning tree based on 15-MIRU-VNTR genotypes of the *M. tuberculosis* Beijing family from three East Asian countries. The 297 circles depicted correspond to the different types discriminated by the 15-MIRU-VNTR genotyping. The origin of each genotype is represented by different colours. The phylogenetic information of strains belonging to each genotype (from Japan and South Korea) is also indicated in colour. The designation of lines in the tree is the same as in Fig. 4. Two arrowheads point to clustering branches where genotypes originating from South Korea gather tightly. An arrow indicates a branch including genotypes of strains from all three countries.

of previous reports indicating that most of the isolated *M. tuberculosis* strains in the Beijing area (76–93 %) belonged to the modern Beijing sublineage (Mokrousov *et al.*, 2006; van Soolingen & Kremer, 2009). These results mean that similarity of 15-MIRU-VNTR types has been preserved in the ancient/modern sublineages of the Beijing family over the three East Asian countries. The phylogenetic validity of similar VNTR types must be verified in *M. tuberculosis* lineages because these genotypes are generally highly homoplastic. However, it is notable that similarity of VNTR types of the Beijing family has been observed based not on their geographical origins but in a phylogenetic manner. One merit of VNTR genotyping is its convenience

for comparison of data from different countries (Allix-Béguec *et al.*, 2008; Mokrousov, 2008). Worldwide data accumulation of VNTR types of *M. tuberculosis* may shed light on the microevolution and genetic diversity of the species. Such global characterization of the phylogeographical distribution of the Beijing family may be useful in providing fundamental information about the ongoing worldwide expansion of the lineage.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (Research on Emerging and Re-emerging