

F66:279-281.)。その結果、Rv2613cは一次構造上の特徴が diadenosine polyphosphate 加水分解酵素と類似しているにもかかわらず、その酵素活性は diadenosine polyphosphate 加リン酸分解活性を示すことを明らかにした。また Rv2613c は他の diadenosine polyphosphate を基質とする酵素とは異なり、溶液中で 4 量体を形成していることも示した。このように、Rv2613c の一次構造上の特徴と酵素活性の関連性が既知の酵素とは異なること、並びに Rv2613c が特徴的な多量体構造を示すことから、Rv2613c の活性中心もしくは基質結合部位の構造が他の diadenosine polyphosphate を基質とする酵素とは異なっていることが予想され、新規抗結核薬の開発に向けて Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインが可能であることが示唆された。そこで本年度は、さらなる詳細な立体構造の解析、並びにアミノ酸残基を置換した変異体の機能解析を行い、Rv2613c の機能と構造の相関を明らかにすることによって、Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインに結びつけることを試みた。

## B. 研究方法

結核菌由来 Rv2613c の立体構造は、Met 残基をセレノメチオニンに置換した変異体の結晶を用いた単波長異常分散法によって決定した。立体構造の比較は Dali Lite ([www.ebi.ac.uk/Tools/dalilite](http://www.ebi.ac.uk/Tools/dalilite)) を用いて行い、比較対象の立体構造 (ヒト由来 diadenosine polyphosphate 加水分解酵素: code 番号 1fit, 1fhi) は Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) より入手した。Rv2613c のアミノ酸残基を置換した変異体は、QuickChange II キット (アジレント・テクノロジー社) を用いて作製した。各変異体は大腸菌内で大量発現させた後、2 段階のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。酵素活性は、これまでに報告した方法 (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. Protein

Expr. Purif., 69 :99-105.) に従い、HPLC を用いて測定した。

倫理面への配慮 本研究は、バイオセーフティーレベルに応じた該当実験室 (P2 レベルまたは P3 レベル) で行った。実験を行う際には研究所内の安全講習を受講するとともに、実験計画について安全委員会の承認を受けている。また、大臣確認実験を必要とする実験 (組換え DNA 実験) については、必要書類を文部科学省に提出し認可されている。実際の実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

## C. 研究結果

本研究で決定した Rv2613c の立体構造について詳細な解析を行った。その結果、Rv2613c は溶液中と同様に結晶中でも 4 量体を形成していた (図 1)。

Rv2613c の立体構造について、一次構造上の特徴が類似しているヒト由来 diadenosine polyphosphate 加水分解酵素 (Fhit) の立体構造と比較を行った。その結果、全体の立体構造は類似していることが示された。Rv2613c が 4 量体を形成する一方で、Fhit は 2 量体を形成しているが、Rv2613c の 2 量体部分 (4 量体の一部) と Fhit の 2 量体を比較した結果、10 本の  $\beta$  ストランドからなる  $\beta$  シートの構造を中心に有している等、両者の立体構造は共通していた (図 2)。

Rv2613c と Fhit の活性中心部位について、構造の比較を行った。その結果、活性中心部位に存在するアミノ酸残基の種類が異なっているものの、両者の構造は良く似ていた (図 3)。

一方、基質である diadenosine polyphosphate が結合する部位について比較を行ったところ、Rv2613c と Fhit の基質結合部位は異なっていることが示された (図 4)。Fhit は 1 つのサブユニットに 1 つの基質が結合しているが、Rv2613c ではサブユニット間の結合が基質の結合に関与していることが示唆された。特に、活性中

心部位が存在するサブユニットとは別のサブユニット中に存在する 160 番目の Trp 残基が基質である diadenosine polyphosphate のアデニンとスタッキング相互作用を形成していることが予想された (図 5)。そこで、160 番目の Trp 残基を Ala 残基に置換した変異体を作製してその活性を測定したところ、酵素活性は失われていた。また、この Trp 残基に着目して一次構造のアライメントを行った結果、他の diadenosine polyphosphate を基質と利用する酵素では、Trp 残基は保存されていなかった。

#### D. 考察

結核菌由来新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素である Rv2613c の詳細な立体構造を決定し、ヒト由来 diadenosine polyphosphate 加水分解酵素である Fhit の立体構造と比較を行った。その結果、全体の立体構造や活性中心部位の構造は非常に良く類似していた (図 2、3)。その一方で、diadenosine polyphosphate が結合する部位の立体構造は大きく異なっていた (図 4)。その理由として、Rv2613c が特徴的な 4 量体構造を形成していることが考えられる。また、活性中心部位には存在しない 160 番目の Trp 残基が活性の発現に関与していることが示された。この Trp 残基は、他の diadenosine polyphosphate を基質とする酵素では保存されておらず、Rv2613c に特異的であることが示唆された。

Rv2613c は、遺伝子破壊株を用いた研究や *in silico* 解析から、新規抗結核薬の標的候補の 1 つとして予想されている。本研究結果から、Rv2613c が特徴的な基質結合部位を有することが示されたことから、Rv2613c に特異的に結合して活性を阻害する新規化合物のデザインが可能であることが示唆された。現在は、新規抗結核薬の開発に向けて、本研究で明らかにした Rv2613c の特徴的な基質結合部位と相互作用が可能で新規化合物のドラッグデザインについて、統合計算化学システ (MOE) を用いて行っ

ている。

#### E. 結論

新規抗結核薬の標的候補の 1 つである結核菌由来新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) は特徴的な基質結合部位を形成していた。このことから、Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインが可能であると考えられる。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. Cloning, purification, and molecular characterization of a novel diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^d$ -tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The 110<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology 2010, 23-27, May, San Diego, CA.
- 2) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^d$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の構造と機能の相関解析. 第 92 回日本細菌学会関東支部総会 2010 年 10 月 東京
- 3) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^d$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の機能構造相関解析. 第 62 回日本生物工学会大会 2010 年 10 月 宮崎
- 4) 森茂太郎, 柴山恵吾, 和知野純一, 荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''- $P^i$ ,  $P^d$ -tetrphosphate 加リン酸分解酵素の活性発現に必要な構造的要因. 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 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

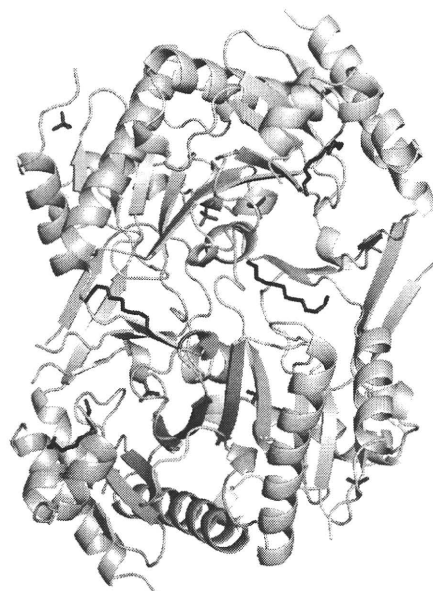
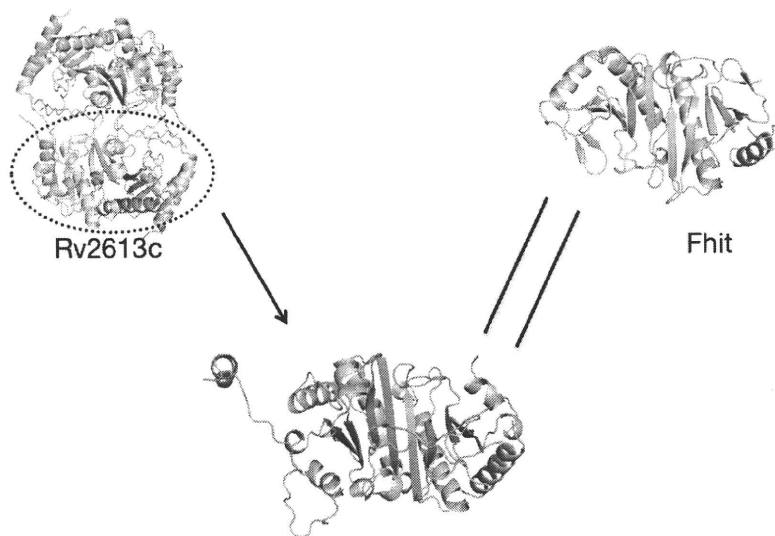


図 1) RV2613c の立体構造 (4 量体)



$\beta$ シートを形成 (5本 $\times$ 2=10本の $\beta$ ストランド)

図 2) Rv2613c と Fhit の立体構造の比較 (構造全体)

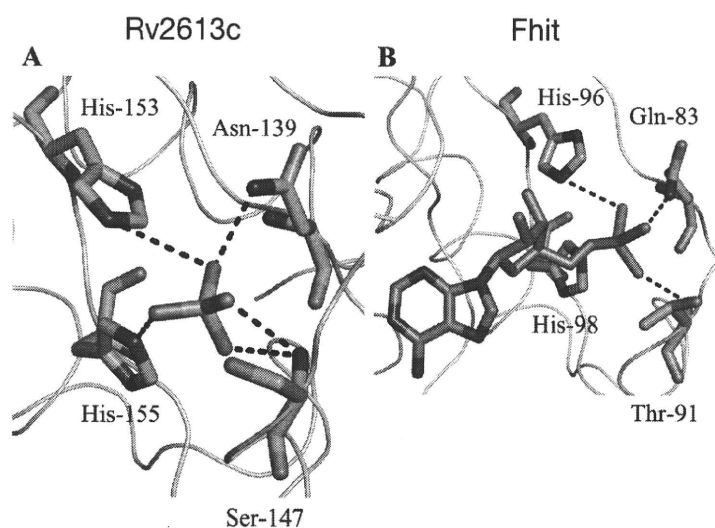


図 3) Rv2613c と Fhit の立体構造の比較 (活性中心部位)  
 A) Rv2613c (リン酸が結合) B) Fhit (アデノシン-タングステン酸が結合)

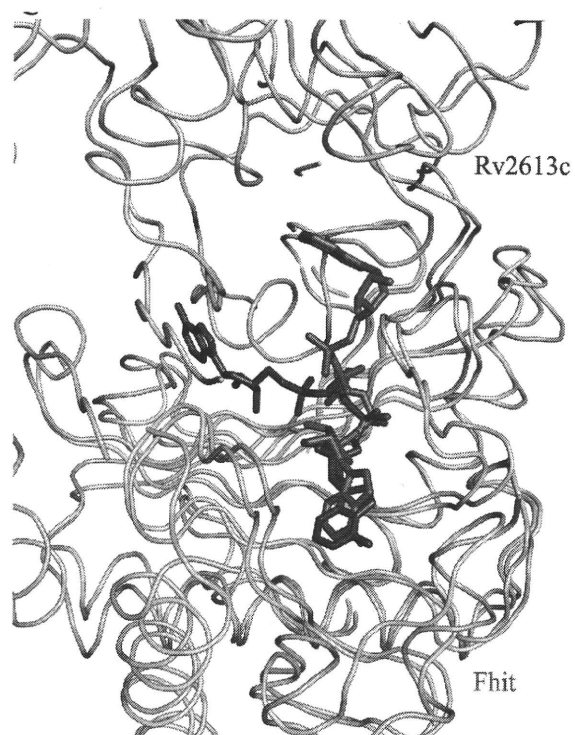


図 4) Rv2613c と Fhit の立体構造の比較 (基質結合部位)  
 赤 : Rv2613c に結合した基質、青 : Fhit に結合した基質

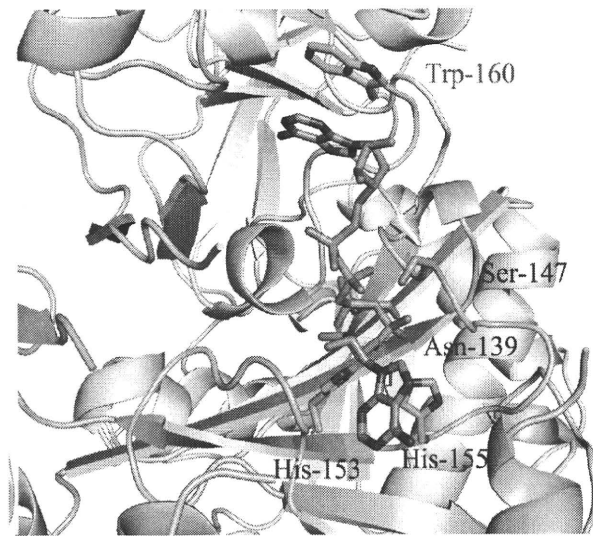


図 5) Rv2613c の基質結合部位  
活性中心部位に存在するアミノ酸残基は緑色で、  
活性中心部位とは別のサブユニットに存在するアミノ酸残基はピンク色で示した。

平成22年度 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)

新規ワクチン開発のための基礎研究

—Th1 誘導型ペプチドによる細胞障害性メモリーT細胞の

分化誘導機構の開発—

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)

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

新規ワクチン開発のための基礎研究

-Th1 誘導型ペプチドによる細胞障害性メモリーT 細胞の分化誘導機構の開発-

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

結核感染防御に必須の細胞障害性メモリーT 細胞の分化を誘導することが結核予防ワクチンの主たる目的である。したがって、細胞障害性メモリーT 細胞を効率よく誘導すること、さらにその生存維持を長期化させることができれば、ワクチンの有効性の増強並びに有効期間の延長につながる。細胞障害性メモリーT 細胞の分化誘導はナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞が最初に抗原感作を受ける時点で決定され、その際に CD4<sup>+</sup> T 細胞による 'Help' が必須であることが示されているが、その機序については未だ明らかではない。

これまでに Th1 分化を選択的に誘導する結核菌分泌蛋白由来のペプチド (Th1 誘導型ペプチド: Peptide-25) 刺激によって活性化した CD4<sup>+</sup> T 細胞がペプチド認識の際に相互作用している樹状細胞を活性化すること、さらにその活性化樹状細胞がナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞から機能的細胞障害性 T 細胞への分化を誘導できることを明らかにしてきた。本研究は、この Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導の分子機構及び Peptide-25 を介した樹状細胞活性化誘導の分子機構、さらに活性化した樹状細胞によるナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞から機能的細胞障害性 T 細胞への分化誘導機構を明らかにし、BCG に代わる新規ワクチンとしての応用性を検討することを目的としている。

本年度は、Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導の分子機構及び Peptide-25 による樹状細胞活性化誘導の分子機構に関して検討を行い、Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が *ifn-γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを、さらに Peptide-25 刺激によって活性化する STAT4 が IL-12 受容体 β2 鎖の発現を調節することによって選択的に Th1 分化を誘導していること、また Peptide-25 刺激によって活性化した CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F と活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞上に発現誘導される CXCR3 が樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子である可能性を明らかにし、これらの分子が結核ワクチンの新たな標的分子となり得る可能性を示した。

A. 研究目的

結核感染防御に必須の細胞障害性メモリーT 細胞の分化を誘導することが結核予防ワクチンの主たる目的である。したがって、細胞障害性メモリーT 細胞を効率よく誘導すること、さらにその生存維持を長期化させることができれば、ワクチンの有効性の増強並びに有効期間の延長につながる。細

胞障害性メモリーT 細胞はグランザイム B を産生する細胞障害性エフェクターT 細胞からさらに分化すると考えられているが、この分化はナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞が最初に抗原提示細胞より抗原の情報を受け取る時点で決定される。この決定には CD4<sup>+</sup> T 細胞の存在が不可欠であり、CD4<sup>+</sup> T 細胞の 'Help' が存在しない場合には細胞障害性メモリー

T 細胞の分化が誘導されないことが報告されている。一旦分化した細胞障害性メモリーT 細胞の維持に関しては IL-15 などのサイトカインが重要な役割を果たしていることが報告されているが、CD4<sup>+</sup> T 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。

これまでに我々が見出した Th1 分化を選択的に誘導するペプチド(Th1 誘導型ペプチド:Peptide-25:アミノ酸配列:FQDAYNAAGGHNAVF)と我々が作出した Peptide-25 特異的 T 細胞抗原受容体(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用いた解析から、①Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導は TCR からの活性化シグナルで誘導される 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、②ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞に既に高発現している STAT4 が IL-12 非依存性の IL-12 受容体(R)  $\beta$  2 鎖の発現を制御している可能性があること、③CD8<sup>+</sup> T 細胞に対しグランザイム B の発現を伴う機能的分化を誘導する樹状細胞の活性化を制御する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用には Peptide-25 刺激によって Th1 細胞へと分化している CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F 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 Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 及び STAT4 の役割及び CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子を明らかにすることを目的に解析を行った。

## B. 研究方法

### (1) Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割の検討

I-A<sup>b</sup> 分子を遺伝子導入した Chinese hamster ovary 細胞(I-A<sup>b</sup>-CHO)を抗原提示細胞とし、Peptide-25 で刺激した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> 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を作成した。そのプレートに T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を添加し、72 時間培養することでナイーブ CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T 細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体存在下に抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、培養 5 日後に Venus 陽性細胞を分取し、抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行ない評価した。また、レンチウイルス感染 T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> T 細胞を回収し、PE 標識抗 IL-12R  $\beta$  2 抗体で染色し、Venus 陽性細胞の IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現を評価した。

### (2) Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における STAT4 の役割の検討

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<sup>+</sup> T 細胞を I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4<sup>+</sup> T 細胞を経時的に回収し、PE 標識抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体で染色し評価した。また、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  $\beta$  2 鎖の発現に対する影響を指標に評価した。

### (3) CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子の検討

C57BL/6 マウス脾臓由来の樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 または TCR に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A (アミノ酸配列:FQDAYNAAAGHNAVF)で刺激し、6 時間後、



12 時間後の mRNA を調製し、東レ社の 3D-Gene を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。3D-Gene 解析にて絞り込まれた候補遺伝子の P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞における Peptide-25 または APL 刺激後の経時的発現変化を Real-Time PCR 法にて確認した。Real-Time PCR 法にて Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現が誘導されることを確認できた IL-17F とケモカイン受容体 CXCR3 の蛋白レベルでの発現様式はそれぞれ ELISA 法、FACS 法にて確認した。

#### 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 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割の検討

これまでにレトロウイルスを用い T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$*  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可能性が示されている。しかしながら、レトロウイルスを用いた強制発現系では非増殖性細胞へ遺伝子導入することはほとんどできない。したがって、導入した TAF7 がその機能を発揮するのは分裂増殖が観察できる Peptide-25 刺激 24 時間後以降と推定される。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再度検討した。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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体存在下に抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、培養 5 日後に TAF7 が導入された細胞を分取し、*ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングを検討した。その結果、TAF7 が導入された細胞でのみ

*ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングが誘導された。

T-bet 遺伝子を強制発現させた CD4<sup>+</sup> T 細胞における解析から T-bet は IL-12R $\beta$ 2 鎖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 $\beta$ 2 鎖発現誘導能に関して検討した。レンチウイルス感染細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> T 細胞を経時的に回収し、TAF7 が導入された細胞の IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を検討した。その結果、TAF7 を導入しても、また T-bet を導入しても IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現誘導及び増強効果は全く見られなかった。

#### (2) Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における STAT4 の役割の検討

活性化 STAT4 が IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を誘導できることが報告されている。そこで、Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における STAT4 の役割に関して検討した。STAT4 の活性化は主に IL-12-IL-12R 相互作用によって誘導されることが知られている。すなわち、IL-12-IL-12R 相互作用によってチロシンキナーゼ Jak2 及び Tyk2 の活性化及びセリン/スレオニンキナーゼ p38MAP キナーゼ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及び 721 番目のセリ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<sup>+</sup> T 細胞を I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4<sup>+</sup> 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- $\alpha$  が STAT4 のチロシンリン酸化を誘導でき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<sup>+</sup> 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。次に、I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> 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  $\beta$  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  $\mu$  M) 及び JNK 阻害剤 SP60015 (2.5  $\mu$  M) を添加しても IL-12R  $\beta$  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  $\mu$  M) を添加すると IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現が完全に抑制された。

### (3) CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子の検討

グランザイム B の発現を伴う CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的細胞障害性 T 細胞への分化には Th1 細胞への分化を誘導するような環境下での CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞との IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用以外の相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化が重要な役割を果たしていること、この相互作用を司る因子を DNA マイクロアレイ法にて検索した結果、27 種類の候補遺伝子を得たこと、そのうち *il-17f* mRNA が Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現誘導されることをこれまでに明らかにしてきた。

さらに解析を進めた結果、残りの 26 種類の候補遺伝子の中で CXCR3 も Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞において mRNA 発現が誘導される因子であった。そこで、樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 または APL で刺激し、IL-17F 及び CXCR3 の蛋白レベルでの発現を解析した。刺激後の培養上清を経時的に回収し、培養上清中の IL-17F を ELISA 法にて検討した結果、刺激 24 時間後まででは Peptide-25 刺激でのみ 1ng/ml 程度の IL-17F が産生されていた。また、CD4<sup>+</sup> T 細胞上の CXCR3 の発現は Peptide-25 刺激後 18 時間以降で有意に上昇するのに対し、APL 刺激では刺激 24 時間後までほとんど誘導されなかった。

## D. 考察

STAT4 欠損及び T-bet 欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞を

用いた解析から T-bet はナイーブ CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリング誘導及び IL-12R  $\beta$  2 鎖発現誘導は STAT4 によって担われていることが報告されている。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞では Peptide-25 刺激によって STAT4 の活性化は誘導されているものの *ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングは TAF7 または T-bet が存在しなければ誘導されないことから、*ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングは STAT4 ではなく、TAF7 及び T-bet によって調節されていることが明らかになった。一方、IL-12R  $\beta$  2 鎖は T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 刺激すると有意に誘導されること、さらに TAF7 または T-bet を導入しても発現増強は見られないことから STAT4 がその発現調節に重要な役割を果たしていることが明らかになった。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が、Peptide-25 刺激した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は 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-12、IL-23、IL-27、IFN- $\alpha$  などのサイトカイン産生は誘導されない。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に誘導されている可能性が高い。また、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報告されている。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予定である。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が、Peptide-25 刺激では p38MAP キナーゼではなく、ERK1/2 が IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現誘導に関与している

可能性が示された。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 $\beta$ 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予定である。

CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る候補因子として IL-17F と CXCR3 を同定した。IL-17F は活性化 T 細胞及び自然免疫担当細胞からホモダイマーとして分泌され、細胞障害活性を増強することで腫瘍の増悪を防ぐこと、また最近の知見で細菌感染防御に関与することが報告されている。また、CXCR3 は CXCR3 を発現した CD4<sup>+</sup> T 細胞と共培養した樹状細胞が癌抗原特異的細胞障害性 T 細胞の細胞障害活性を増強できることが報告されている。今後、IL-17F、CXCR3 の樹状細胞の活性化能の有無に関して検討する予定である。

本研究において IL-17F と CXCR3 が樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子である可能性が明らかとなり、これらの分子が結核ワクチンの新たな標的分子となり得る可能性を示した。

## E. 結論

(1) Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が *ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングを、さらに Peptide-25 刺激によって活性化する STAT4 が IL-12 受容体  $\beta$ 2 鎖の発現を調節することによって選択的に Th1 分化を誘導していることが明らかになった。

(2) Peptide-25 刺激によって活性化した CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F と活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞上に発現誘導される CXCR3 が樹状細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子である可能性が明らかになった。

## 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<sup>+</sup> 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. 45<sup>th</sup> 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<sup>+</sup> 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

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

慢性持続感染機構解明のための抗酸菌制御システムの解析

分担研究報告書

研究分担者

星野 仁彦

(国立感染症研究所・室長)

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

慢性持続感染機構解明のための抗酸菌制御システムの解析

研究分担者 星野 仁彦（国立感染症研究所・感染制御部・室長）

研究要旨.

結核菌感染症は一度発病すると臨床的治癒後も結核菌は宿主の体内に残り持続潜伏感染状態が継続する。そのため慢性持続結核菌感染症患者群から再燃可能性が高い患者群を抽出することは厚生行政の観点そして医療経済の観点から重要なことである。我々は micro RNA (miRNA) の発現パターンが結核菌の再燃可能性を予測しうるバイオマーカーになりうることを仮定して研究を開始した。肺結核に感染した患者の治療前の末梢血単核球を使用して miRNA の発現を検討した。多くの miRNA は結核感染症と直接の関係が示唆されなかったが、各々3つの miRNA が健常者と比較して上昇あるいは低下していることが認められた。これらの miRNA は interferon や nitric oxide synthase などの抗酸菌感染防御において重要な宿主反応を制御していることが示唆されるものであった。次年度以降は動物実験モデルを併用しながらこれらの miRNA が結核菌感染症再燃を示唆するバイオマーカーとして使用できないかどうか検討する予定である。

A. 研究目的

micro RNA (miRNA) は 18-25 ヌクレオチドの小 RNA である。多彩な生命現象を制御していることが判明している。一例として miRNA は messenger RNA (mRNA) degradation や cleavage を誘導していることが知られる。つまり生命現象の細かな制御 (fine tuning) を行っていると考えられる。miRNA はさまざまな癌・リンパ腫で発現が確認されている。慢性リンパ性白血病では特定の miRNA の欠失と発病の間に正の相関があることが知られている。ウイルス感染でも発現が確認されている。C 型肝炎ウイルスの複製に宿主の miRNA が関与している。その miRNA は肝臓のコレステロール代謝も制御している。しかし現在のところ抗酸菌感染症における宿主の miRNA の役割は不明である。

結核菌感染症は一度発病すると、化学療法によって臨床的に治癒した後も結核菌は宿主の体内に残り持続潜伏感染状態が継続する。一部の患者においてはその後宿主の免疫状態などの変化により再燃を起こすこ

とが知られている。よって本邦に多数存在する結核持続潜伏感染患者（＝結核菌感染症確定患者であり化学療法終了時治癒患者全員）の中から、どの患者群が結核菌感染症を再燃する可能性があるかを予知することそしてその患者群に対してのみ再燃予防治療を追加することが、厚生行政の観点からまた医療経済の観点から重要であると考えられる。

いままで潜伏状態からの再燃を予知する方法として、結核特異的タンパクの検出、結核特異的タンパクに対する抗体あるいは結核特異的タンパクを認識する T リンパ球の検出などが試みられてきたが明確な結論は見られなかった。おそらく血清中に存在するこれらのタンパク質の量が微量であるかその発現に時間がかかるためかと推測される。この点において miRNA は RNA に属するのでタンパクに対して発現時期が早くまた発現量も多くなることが予想されるので結核菌感染症再発のバイオマーカーの候補になる可能性がある。

miRNA が宿主の細かな制御を行うのであ

れば、結核潜伏感染状態から再燃を起こす際に前もってその発現に変化が起こるかもしれない。抗酸菌感染症の潜伏期から活動期にその発現が変化する miRNA は逆に活動期から潜伏期に移行する際にも逆方向に発現が変化することが予想される。

本研究では抗酸菌慢性持続感染に関与する miRNA を臨床検体を使用したプロファイリングにより同定し、同定した miRNA を利用し患者疫学調査を行うことで、発病可能性が高い潜在性結核患者集団を同定することを目的とした。

## B. 研究方法

具体的な研究を行う前に結核感染患者コホートを作成した。あらかじめコホートを作成することで治療終了後も患者を追跡しやすくなり、再燃の有無を確認することが容易となる。治療前に喀痰から結核菌を分離し臨床施設にて保存（再発の場合、再感染の有無を確認）治療前と治療後に採血し、PBMC・plasma を液体窒素に保存した。治療経過・治療終了後の経過観察は主治医によって行われる。

今年度は肺結核新規入院患者 10 名の治療前の末梢血から分離した末梢血単核球 (PBMC) を使用した。PBMC から miRNeasy kit (Quiagen 社) を使用して miRNA を抽出し、human miRNA array kit I & II (Signosis 社) により PBMC に存在する miRNA を検出した。この array によって総計 132 個の miRNA を検出することができる。

コントロールとして結核感染の既往のない 5 名の健常人から同様の操作を繰り返し miRNA を検出した。

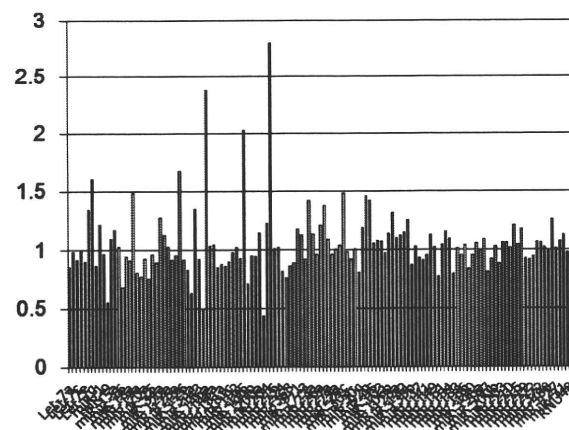
倫理面への配慮 国立感染症研究所および各医療機関に設置されている倫理委員会で倫理審査の承認後、患者からは書面によるインフォームドコンセントを得た。また利益相反は存在しなかった。

## C. 研究結果

新規結核感染患者の PBMC に発現する miRNA あるいは健常人の PBMC に発現する miRNA は量の多少はあるがそれぞれの群に

おいて同様の発現傾向が存在した。そこで各々の miRNA 発現量を平均化したのち比 (= 結核患者/健常人) を取ることで解析を行った。

下図に示した様に多くの miRNA は比 = 1.0 前後の数値を示しこれらの miRNA の発現は抗酸菌感染症と直接関連性が存在しないように見られた。しかし比 = 2.0 を超える miRNA が 3 種類、比 = 0.5 以下の miRNA が 3 種類見出された。これらは各々の結核感染患者でも発現上昇あるいは低下が見られていたので、結核菌感染に関連して miRNA の発現に変化が生じた可能性が考えられた。これらはガンやリンパ腫のバイオマーカーとして使用が検討されている種類の miRNA とは異なるものであった。このことは計 6 種類の発現に変化がある miRNA は感染症特異的である可能性が示唆された。



(図) 結核感染患者 PBMC 由来の miRNA 発現と健常人 PBMC 由来の miRNA 発現の比を取ったもの。(比 = 結核患者/健常人)

(1) 比 = 2.0 を超えた miRNA (結核菌感染者の PBMC で発現上昇が見られた miRNA)  
これらの miRNA には miR-146a, miR-195, miR-206 が含まれた。

(2) 比 = 0.5 を下回った miRNA (結核菌感染者の PBMC で発現低下が見られた miRNA)

これらの miRNA には miR-200c, miR-145, miR-9 が含まれた。

## D. 考察

今年度の研究で結核菌感染患者治療前の

PBMCは健常人のPBMCと比較して各々3種類ずつのmiRNAの発現上昇・低下が確認された。その中でmiRNA-145やmiRNA-146aはinterferonの制御特にSTAT-1, IRF-5, TRAF-6の制御に関連していることが判明している。これらは抗酸菌感染制御に重要な因子である。特にmiRNA-146aは自然免疫制御に関連することが報告されており、またTh1 phenotypeに関連していることが示唆されている。他にもTreg細胞においてTh1反応を制御していることも知られており抗酸菌感染症でmiR-146が上昇している可能性は高い。またmiR-195やmiR-200cはNorthern blottingの結果から臓器特異性が肺であることが判明しており、肺特異的なmiRNAが末梢血単核球で有意な発現の上昇や低下が見られることは興味深い。その他にも抗酸菌殺菌の際に重要な因子であると言われるnitric oxide synthaseを制御するmiRNAとされるmiR-206が結核感染者で上昇しているのは、抗酸菌感染症の重症度のバイオマーカーになる可能性も考えられる。

次年度以降は動物実験モデルを使用して潜伏感染状態を作成し、その状態から再燃する際に今回検出されたmiRNAの発現が実際に変化しているかどうかを検討する予定にしている。また結核感染症の治療は最低6か月かかるので今年度は治療終了時のPBMCを使用することができなかった。次年度は治療前と治療後の同一患者の検体を使用してmiRNAの発現解析を実施する予定であるので、個体の個人差を極力減らすことができると考えている。

#### E. 結論

結核感染症治療前の末梢血単核球由来のmiRNAを使用して、6種類の感染症特異的と考えられるmiRNAを検出できた。これらのmiRNAは抗酸菌感染を制御する際に重要な役割をしていると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi, H., A. Nolan, B. Naveed, A. L. Comfort, W. N. Rom, Y. Hoshino, and M. D. Weiden. Neutrophils activate alveolar macrophages by producing caspase-6-mediated cleavage of IL-1 receptor-associated kinase-M. J. Immunol. in press.
- 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. Multiple Cases of Cutaneous *Mycobacterium massiliense* Infection in a "Hot Spa" in Japan. J. Clin. Microbiol. in press.

##### 2. 学会発表

- 1) Kobayashi, H., A. Nolan, B. Naveed, A. L. Comfort, W. N. Rom, Y. Hoshino, and M. D. Weiden. Neutrophils Activate Alveolar Macrophages By Producing Caspase-6 Mediated Cleavage Of Interleukin-1 Associated Kinase-M (IRAK-M) In Tuberculosis. The 105<sup>th</sup> International Conference of American Thoracic Society 2010, 14-19 May, 2010, New Orleans, USA. (Am. J. Respir. Crit. Care Med., May 2010; 181: A3221).

#### 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  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

自然免疫系による結核感染防御機構の解析

分担研究報告書

研究分担者

竹田 潔

(大阪大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（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

自然免疫系による結核感染防御機構の解析

研究分担者 竹田 潔 （大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授）

研究要旨

自然免疫系の結核感染防御における役割を解析するため、マクロファージで IFN- $\gamma$  や結核菌をはじめとした細胞内寄生性微生物の感染によりその発現が強く誘導される Guanylate-binding protein (GBP) family に注目した。GBP ファミリーは極めて相同性の高い分子 11 個から成る分子群で、まだその機能は明らかになっていない。これら分子群は相同性が極めて高いため、一つの遺伝子の欠損マウスを作製しても、他のファミリー分子がその機能を代替している可能性がある。GBP ファミリーの遺伝子がクロモソーム 3、5 にそれぞれ 5 つの遺伝子が近接して並んで存在している。そこで、クロモソーム 3、5 の GBP ファミリー遺伝子を全て欠失させたマウスを遺伝子欠損マウスの作製法を応用して作製した。今後、結核菌の感染モデルを導入し、GBP ファミリーの結核感染における役割を明らかにしていきたい。最終的には、患者接触者に対する予防的治療薬の開発に結び付ける。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

これまでに、結核菌の経気道的感染により、TLR 依存性に感染早期（2 日以内）に肺胞腔に肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージから分泌されるリポカリン 2、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の機

能を解析し、それぞれ鉄イオンの取り込み抑制、細胞膜透過性亢進により結核菌の増殖を抑制していること、個体レベルでも結核感染に重要な役割を担っていることを遺伝子欠損マウスの解析により明らかにしてきた。本研究では、さらに自然免疫関連遺伝子の結核感染防御における役割を遺伝子欠損マウスの作製、解析により明らかにしていく。その遺伝子候補の一つとして、Guanylate-binding protein (GBP) family の結核感染における役割を解析する。GBP は、極めて相同性の高いファミリー分子 11 個からなる分子群であり、GBP1, 2, 3, 5, 7 のゲノムがマウスクロモソーム 3、GBP4, 6, 8, 9, 10, 11 のゲノムがマウスクロモソーム 5 でそれぞれ近接して存在している。これら GBP ファミリー分子は、マクロファージ系細胞で IFN- $\gamma$  や、細胞内寄生性細菌の感染により発現が強く誘導されることから、感染防御に深く関与していることが考えられているが、これまでにその機能はほとんど明らかにされていない。その理

由に、極めて相同性の高い分子がいくつも存在しているため、たとえ1遺伝子をノックアウトしても他のファミリー分子がその機能を代替するためであることが考えられる。そこで、本研究では、GBP ファミリー分子をまとめて欠失させたマウスを作製する。クロモゾーム3に存在する GBP ファミリー、クロモゾーム5に存在する GBP ファミリー、それぞれES細胞を用いたノックアウト法によりまとめて欠失させる。まず、それぞれの遺伝子の一番5'端側にある遺伝子を定法によりES細胞でネオマイシン遺伝子に置換させる。その際loxPサイトを導入しておく。さらに、このES細胞クローンで、その逆の3'端側の遺伝子も同じようにloxPサイトを導入する。そして、同一ゲノムにloxPサイトが導入されたES細胞クローンを選択し、このES細胞にCre遺伝子を発現させ、loxPサイトで挟まれたゲノム(GBPファミリー遺伝子すべて)を削除させる。このES細胞クローンを用いて、B57BL/6マウス由来の胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウス、ヘテロマウス、ホモマウスを作製する。このようにして、クロモゾーム3, 5それぞれのGBPファミリー遺伝子を全て削除したマウスを作製する。このマウスに結核菌を経気道的に感染させ、野生型マウスと感受性を比較する。

#### 倫理面への配慮

本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

#### C. 研究結果

GBPファミリーのクロモゾーム3, 5遺伝子をそれぞれ全て欠失させたマウスを作製することに成功した。GBPクロモゾーム3欠失マウスからマクロファージを単離し、IFN- $\gamma$ 刺激依存性のGBP1, 2, 3, 5, 7

遺伝子のmRNAの発現をノーザンブロット法により解析したところ、どの遺伝子の発現も認めず、GBPファミリー遺伝子をまとめて欠失させたマウスの作製に成功した。このマウスに、結核菌と同じくマクロファージなどの細胞内に寄生する原虫*Toxoplasma gondii*を感染させたところ、野生型マウスではほとんど死なないにも関わらず、GBPクロモゾーム3欠失マウスは大半が死亡した。

#### D. 考察

GBPファミリーの欠失マウスの作製にES細胞を用いたノックアウト法を応用して、成功した。GBPクロモゾーム3欠失マウスは、細胞内寄生性原虫*Toxoplasma gondii*に対する感受性が高いことから、結核菌についても経気道感染実験を導入し、結核感受性に対する感受性をこれから解析していく。

#### E. 結論

遺伝子欠損マウスの作製方法を応用し、極めて相同性の高い分子ファミリーGBPの遺伝子をまとめて欠失させたマウスを作製した。このマウスに結核感染実験を導入することにより、GBPファミリーの結核感染防御における役割を明らかにできるも小野と考えられる。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) Takeda, K. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. 31 May - 3 June, 2010, Greifswald, Germany
- 2) Takeda, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology,

Immunology, and Cell Biology, 12-13  
July, 2010, Osaka, Japan

- 3) Takeda, K., and H. Kayama.  
Regulation of innate immune  
responses at the intestinal mucosa.  
14<sup>th</sup> International Congress of  
Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe,  
Japan
- 3) 竹田潔. 自然免疫系の活性制御と腸管  
炎症. 第22回微生物シンポジウム(特  
別講演)、2010年9月3-4日、大阪
- 4) Takeda, K. Innate immune responses

at the intestinal mucosa. Annual  
Meeting of The Society for Leukocyte  
Biology & The International  
Endotoxin and Innate Immunity  
Society, 7-9 October, 2010,  
Vancouver, Canada

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