

201104001A

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業  
(国際医学協力研究事業)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦  
(国立感染症研究所・感染制御部部长)

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
地球規模保健課題推進研究事業  
(国際医学協力研究事業)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦  
(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成24(2012)年3月

## 目 次

総括研究報告書：国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備 牧野 正彦（国立感染症研究所） .....	1
分担研究報告書：抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発 牧野 正彦（国立感染症研究所） .....	7
抗酸菌の病原性と免疫誘導機構 光山正雄（京都大学） .....	13
抗酸菌感染における免疫防御誘導機構 吉開泰信（九州大学） .....	19
薬剤耐性結核菌の迅速検出法 鈴木定彦（北海道大学） .....	23
自然免疫系による結核感染防御機構の解析 竹田 潔（大阪大学） .....	29
抗酸菌感染症と神経障害 後藤正道（国立療養所星塚敬愛園） .....	31
結核菌の分子遺伝学 谷口初美（産業医科大学） .....	37
非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究 後藤義孝（宮崎大学） .....	41
抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する細菌学的・免疫 学的な基礎研究 瀧井猛将（名古屋市立大学） .....	45
宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の分子と宿 主要因に関する研究 大原直也（岡山大学） .....	49
結核菌・非結核性抗酸菌の遺伝的多様性とその進化・疫学・ 臨床的意義の解明 岩本朋忠（神戸市環境保健研究所） .....	55
ハンセン病におけるマクロファージの機能解析 福富康夫（国立感染症研究所） .....	61
新規結核ワクチンの開発と応用 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター） .....	65

結核菌によるファゴリソーム形成阻害過程の研究 小出幸夫（浜松医科大学）	71
ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析 長谷 篤（大阪市立環境科学研究所）	75
抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究 慶長直人（国立国際医療センター研究所）	79
抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究 向井 徹（国立感染症研究所）	85
結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究 田村敏生（国立感染症研究所）	89
結核疫学解析、結核の臨床研究 松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）	95
結核病態に関する分子生物学的研究 松本壮吉（大阪市立大学）	99
抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序 杉田昌彦（京都大学ウイルス研究所）	105
抗酸菌における菌体構成成分の動態解析 宮本友司（国立感染症研究所）	109

研究成果の刊行に関する一覧表	113
----------------	-----

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
総括研究報告書

国際共同基盤研究に応用する抗酸菌感染症研究の整備

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

結核は年間 800 万人の新規発症患者と 200 万人の死亡者を生み、世界人口の約 3 分の 1 の人が感染している 20 世紀最大の恐怖を与えた細菌感染症であり、現在でもその恐怖は続いている。日本においても年間 2.5 万人の新規発症患者が見られ、減少率の鈍化に歯止めがかけにくい再燃感染症でもある。また、ハンセン病は末梢神経障害に起因する進行性四肢機能障害がゆえに長期にわたり差別と偏見の対象となってきた社会的にも科学的にも重要な慢性感染症である。この 2 大抗酸菌感染症において最重要課題は、発症予防技術の確立と薬剤耐性菌に対する診断・新治療法の開発である。本研究班においては、近年まで用いられてきた BCG に改良を加え、新しいリコンビナント BCG を開発をしてより有効なワクチンを作製することを最終目的として、リコンビナント BCG に組み込む結核菌及びらい菌に共通して存在する主要抗原の探索を行った。その結果として有用な膜蛋白質が候補として同定された。さらに、高齢者に発症し易い再燃型結核を予防するために、CD8 陽性キラー T 細胞をより強く活性化するために必要不可欠な因子の解析を行い、新たな必須因子の同定に成功した。さらに、CD8 陽性 T 細胞を効率的に活性化するためには、主要組織適合抗原を介した活性化機構に加えて、CD1 抗原を介した CD8 陽性 T 細胞の活性化が重要であるが、CD1 を介した活性化に用いられる脂質抗原の生体内動態が明らかとなった。さらに、宿主自然免疫応答活性化機構を通じて、結核菌感染直後に結核菌を死滅し得る自然免疫応答機構が存在し、予防的治療薬として今後薬剤が開発されることが期待できることが判明した。また、多剤耐性菌の診断方法として、結核がまん延している発展途上国でも有効利用し得る簡易・迅速診断法である LAMP 法が開発された。さらに、40 年来培われてきた日米医学協力計画における研究の蓄積を活かしながら、種々の新たな研究手法により、我国のみならずアジア諸国での新たな抗酸菌対応策の樹立に向けた基盤的研究を展開した。結核では HIV-1 との重複感染、ハンセン病では早期診断のための血清診断の技術伝播を図った。同時に、感染症対策には人的交流を通じた近隣アジア諸国との連携も重要であり、近隣アジア諸国の研究者を積極的に受け入れスキルの向上を図った。

分担者

光山正雄（京都大学・教授）  
吉開泰信（九州大学生体防御医学研究所・教授）  
後藤正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）  
谷口初美（産業医科大学・教授）  
後藤義孝（宮崎大学・教授）  
瀧井猛将（名古屋市立大学・准教授）

大原直也 (岡山大学・教授)  
岩本朋忠 (神戸市環境保健研究所・副部長)  
福富康夫 (国立感染症研究所・室長)  
岡田全司 (国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センター長)  
小出幸夫 (浜松医科大学・理事)  
鈴木定彦 (北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授)  
長谷 篤 (大阪市立環境科学研究所・課長)  
竹田 潔 (大阪大学・教授)  
慶長直人 (国立国際医療研究センター研究所・部長)  
向井 徹 (国立感染症研究所・室長)  
田村敏生 (国立感染症研究所・室長)  
松本智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・部長)  
松本壮吉 (大阪市立大学・准教授)  
杉田昌彦 (京都大学ウイルス研究所・教授)  
宮本友司 (国立感染症研究所・主任研究官)

#### A. 研究目的

病原性抗酸菌感染症においては、BCG 接種による予防法や既存の抗結核薬に立脚した治療は、ほぼ限界に至っている。本研究班では、結核菌による感染・発病の機構、潜伏化・慢性化の機構解明、感染病態の解明などの基礎的研究に加え、新たな予防方策の開発、迅速診断法の開発、迅速な薬剤耐性菌同定試験法の開発など、学術的研究と実際の応用研究を組み合わせ、包括的な基盤研究を行うことを目的とした。特に、高速解析が可能で入手し易くなったゲノム情報を効率的に利用し、さらに、種々の遺伝子改変マウスを用いた分子免疫学研究技法を取り入れ、新たな展開を図る。培養不能ならい菌によって発症するハンセン病についても、同様に感染病態の把握に立脚した予防・治療法の新規開発と新規迅速検査診断法の開発を主目的とした分子免疫学的研究を中心に行う。結核菌とらい菌の相同性と相違点を利用した研究も展開する。海に囲まれた日本は、近隣アジア諸国との外交関係なしには存在し得ず、近隣諸国への国際的対応は日本とアジア諸国の科学的併行的進展に必要不可欠である。とりわけ、近年目覚ましい発展を遂げた分子生物学的技法を用いた最新技術を確立し、技術移転を図り、近隣諸国とその手法を共有することは、結核やハンセン病の駆逐を目指す上で

大きな貢献に繋がるものである。本年度の最重要課題の一つ、結核菌-HIV-1 の重複感染の病態生理の解明と、ハンセン病の早期非侵襲性診断に係る技術伝播を図る。また、抗酸菌に既存感染した日本人高齢者への対応、とりわけ発症予防戦略の構築に有用な追加免疫ワクチンの開発において、直接的研究成果が得られるものと期待される。さらに、減少傾向に鈍化がみられる現在、とくに意識的対応が必要とされる感染症であることは間違いない。結核菌およびらい菌の分子生物学、結核症およびハンセン病の免疫生物学は、学術的観点からも、いまだに重要なテーマである。本研究により、基本的な病態機構に新たな理解が深まることは、生命科学的にも大きなインパクトを与え、若手研究者の育成にも役立つ。新規抗酸菌ワクチン、新規迅速診断法などの確立は、直ちに国内外での実際の応用として貢献することが期待できる。アジア近隣諸国研究者を積極的に受け入れ、継続性のある共同研究を樹立する。

#### B. 研究方法

結核菌／結核に関する研究：

1. 強い病原性及び抗原性を発揮する結核菌の潜伏性慢性持続感染を誘導する機構を、細菌遺伝子のノックアウト、候補遺伝子産物のリコンビナン

ト蛋白作製等の手法で種々の遺伝子改変マウスを用い解析(光山、谷口、松本壮)。病原性及び抗原性を担う分子の生合成経路の解析(松本壮)

2. ファゴゾーム-ライソゾーム融合阻止・肉芽腫形成・組織傷害などの結核に特徴的病態発現は、自然免疫及び獲得免疫を主体とした宿主応答に依存する。その分子機構を動物モデルを用いて主に分子免疫学的、分子生物学的手法を用いて解明し、発症機構を解明(竹田、小出)。結核菌の自然免疫回避機構を分子レベルで解析(竹田)。新規薬剤開発ターゲットの探索(大原)
3. 抗結核防御免疫応答を司る抗原提示細胞とT細胞を中心とした細胞性免疫応答の誘導と活性化機構を免疫生物学的観点から解析。同時に、予防的及び治療的ワクチンを含めた免疫治療開発基盤を構築(牧野、吉開、田村、杉田、瀧井)。脂質及び糖脂質の免疫制御系を解析するため遺伝子改変マウスを作製(杉田)。BCGワクチンの安全性と亜群の差異を解析(瀧井)
4. 多剤耐性結核菌に対する治療効果を反映する宿主因子の同定(慶長)。異なる主要組織適合抗原を有すマウスによる感受性や病態の違いから、系統発生的なアプローチを試行(岩本)。非結核性抗酸菌のヒトへの病原性をスクリーニングする方法を開発(後藤義)
5. 培養に長期間を要する結核菌の検出を迅速かつ確実にを行う新たな手法を開発し、その特異性を解析(鈴木)
6. BCG非依存性高免疫原性新規予防的及び治療的ワクチンの開発を多方面から遂行(岡田、田村)。サルを用いてワクチン効果を判定(岡田)
7. 結核多発地域での分子疫学から、市中における伝播様式及び結核菌の分

化・進化を探り、臨床的対応の方法論を確立(長谷、岩本)。非結核性抗酸菌を含め薬剤耐性を獲得し易い菌を遺伝的相同性及び系統発生的に同定(岩本)

8. リファンピシン耐性結核菌及びMACのリファブチン感受性の検討(松本智)

らい菌/ハンセン病に関する研究:

1. ハンセン病の標的組織である末梢神経の侵襲機構について、臨床材料とモデル動物を用い平行して病理学的に解析。ハンセン病末梢神経障害発症モデルを開発(後藤正)
2. BCGの有効性は26%と報告されている。BCGの欠点を凌駕し、かつらい菌の主要抗原を有効利用し強烈にT細胞活性化能を有するリコンビナントBCGを作製評価(牧野)
3. らい菌の宿主免疫応答誘導機構、とりわけ、らい菌殺戮機構をヒトおよび動物細胞レベルで解析。細胞内寄生機構の解明(福富)
4. 安全かつ安定にEGFPを発現するBらい菌を作製するための新規プロモーターの樹立(向井)
5. 人獣共通感染症としてのらい菌のヒト及び動物への感受性の検討(鈴木)
6. 菌体構成成分特に糖脂質分子の基礎的代謝に影響を及ぼす環境下での構成・構造上の変化を生化学的に解析し、ターゲット分子を同定し、抗酸菌の活動性や潜伏化に関与する機能変化を解析(宮本)

倫理面への配慮 当該研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全を守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。

また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

1. 強い抗原性を有し、自然免疫及び獲得免疫の両者を活性化すると同時に、結核菌感染抗原提示細胞表面に発現して、抗結核ワクチン候補分子となり得る抗原として MMP-II を同定した(牧野)。
2. 結核菌の病原性因子がマクロファージのサイトカイン産生能に及ぼす影響を解析した。PPE37 または NF- $\kappa$ B、ERK 及び p38 の活性化を抑制し、その結果各種サイトカインの産生を抑制し、結核菌の細胞内寄生に関与していた(光山)。
3. 結核の発症機構として抗酸菌が経気道感染すると、肺において  $\gamma$   $\delta$  T 細胞が感染早期に IL-17 を産生し、好中球浸潤を誘導することが重要であった(吉開)。
4. *M. ulcerans* の感染により発症する難治性皮膚疾患ブルーリ潰瘍の無痛性は、起因菌が産生する毒性脂質マイコラクトンによるシュワン細胞の細胞壊死とアポトーシスによることが明らかとなった(後藤正)。
5. 細胞内増殖性に影響を及ぼす結核菌の遺伝子解析を行い、結核菌遺伝子 Rv1388-Rv1389-Rv1390 (rpoZ) が細胞内増殖性や薬剤感受性に影響を与えることを明らかにした(谷口)。
6. 従来非病原性抗酸菌として広く遺伝的研究に用いられてきた *M. smegmatis* は大量に静脈内接種すると菌体の大部分は生体外へ排除されるものの、感染早期にサイトカインを産生し、長期間にわたり肉芽腫を維持した。ワクチン開発にあたり、有用な抗原キャリアーとなり得る可能性が示唆された(後藤義)。
7. 抗酸菌症のワクチンとして用いる BCG 亜株による抗原提示能の増強には、メトキシニコール酸が関与する可能性が示唆された(瀧井)。
8. 結核菌のストレプトマイシン耐性獲得機構はこれまで不明であったが、16S rRNA の点変異で誘導されることが初めて明らかとなった(大原)。
9. 世界的に感染者が増加している代表的な非結核性抗酸菌症である *M. avium* 感染症の日本と韓国の臨床分離株の遺伝子型を解析したところ、両国は近隣であるにもかかわらず、異なる遺伝子型を有していることが判明した。両国の *M. avium* は欧米型の遺伝子型とも異なっており、急速な伝播をしていることが判明した。また、日本の菌株のほとんどは浴室環境に由来することが判明した(岩本)。
10. 細胞内寄生菌であるらい菌のインターフェロンガンマによる抗らい菌活性には、NADPH オキダーゼを構成する各種 phox 蛋白の発現増強が関与することが明らかとなった(福富)。
11. キラーT 細胞から産生される Granulysin と Ksp37 は相乗的に作用し、DNA ワクチンとして用いた場合、生体内において結核菌の増殖を抑制する上で有用であった(岡田)。
12. アクチン結合性蛋白 Cora 1a をノックダウンするとマクロファージ内で結核菌はオートファゴゾームを形成し、結核菌の増殖が抑制された(小出)。
13. 全ての結核菌が共通して保有する Direct Repeat 領域を標的として、迅速・簡便かつ安価な薬剤耐性結核菌の遺伝子型別法を開発した(鈴木)。
14. 結核菌株のゲノム比較を目的として次世代シーケンサーを用いたマルチプレックス解析を行った。東アジア地域に蔓延する北京型結核菌の中から定着傾向を示す G5/6 亜系統群について、各

株の共通／固有変異を抽出し、今後の分子疫学解析を容易にした（長谷）。

- 1 5. 結核菌の病原性因子の一つである ESAT-6 はマクロファージ内で LAMP-1 に結合し、LAMP-1 を分離することでマクロファージの成熟化を抑制することを見出した（竹田）。
- 1 6. 結核の活動性と個体の栄養状態との相関関係を Adiponectin、Fetuin-A、RBP4 を指標に検討した。ベトナムとの国際共同研究を推進したが、各指標はそれぞれ異なる動態を示し、一定の関連は認められなかった（慶長）。
- 1 7. 抗酸菌の生体内イメージ解析を容易にするため、抗酸菌へ自家発光する bioluminescence を導入するため、promotor の選択・塩基配列の解析。各 ORF の BCG codon usage 至適条件決定した（向井）。
- 1 8. IL-17F が CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導し得る樹状細胞の活性化に必須な因子であることを明らかにした（田村）。
- 1 9. 結核診断用キット、クオンテフェロンの世代間の有用性を比較検討した。2 世代間には有意の乖離があった（松本智）。
- 2 0. 結核の発症機構を解明する目的で結核菌の増殖に必須な鉄代謝メカニズムを解析した。結核菌のヒストン様蛋白（MDP1）は、鉄の偽害性を低減させるとともに鉄を貯蔵し有効利用していることが判明した（松本壮）。
- 2 1. 結核菌のグルコースミコール酸は、TH1 型サイトカイン産生にシフトしたメモリー応答を惹起することが明らかとなり、ワクチン開発等の抗酸菌生体防御に大きく貢献し得る可能性が示唆された（杉田）。
- 2 2. 抗酸菌の細胞内寄生に関与する抗酸菌代謝機構を解析した。アミノ酸関連化合物は結核菌に偏在しており、菌種間において代謝系の仕組みが異なることが明らかとなった（宮本）。

（アジアへの貢献）

1. 診断に困難を伴う少菌型ハンセン病の血清診断法に改良を加えるため、新たな血清診断用抗原候補を同定した。さらに、これまでに確立した方法をアジア諸国へ技術移転した（牧野）。
2. マレーシア及び中国からの留学生複数に対し、感染防御免疫に関する知識と実験手技の技術伝播を果たした。彼らの自国での研究推進において役立つものと期待される（光山）。
3. アジア諸国に蔓延する多剤耐性結核に対する治療用ワクチンの共同研究を展開した（岡田）。
4. 新たに開発した薬剤耐性結核菌の迅速検出法を、フィリピン・タイ・ミャンマー・ネパール及び中国へ技術移転し、自国での結核分子疫学解析を可能とした（鈴木）。
5. 結核の活動性と個体の栄養状態との関連について、ベトナム国と国際共同研究を行い解析した。さらに、結核菌-HIV-1 重複感染の病態生理の把握に関する技術伝播を行った（慶長）。

#### D. 考察

結核は現在でもその恐怖は引き続けている。我国でも、減少率の鈍化に歯止めが掛けにくい再興感染症である。定期検診と BCG 予防接種を法的に定め、徹底することで一定の成果を挙げた。しかし、小児期結核を除き BCG の予防効果は、ほぼ無効と結論されるに至り、都市の青年層を中心としたアウトブレイクは定期健診では対応しきれないことが判明した。高齢者の再燃発症型結核の予防方策も未確立である。新規抗結核薬による治療は奏功したものの、近年、多剤耐性結核の増加が著しくなり、新規薬剤開発を含めた今後の対応には大きな懸念が抱かれている。一方、同じく抗酸菌に分類されるらい菌によるハンセン病は、アジア諸国では今なお年間 30 万人の新規患者が発生している。我国では、抗酸菌の研究はかつて一世を風靡したが、現在研究者は減少の一途を辿っている。近隣のアジア諸国

においても研究者の減少は大きな問題となっている。このような現状に鑑みて、近年著しく発展した分子微生物学、免疫学、分子疫学的手法を活用し、これまで機序不明であった現象を説明可能とし、より詳細な分子機構解析から新たな対策の確立に貢献すべき基礎的臨床的研究が急務となっている。本研究では、結核、ハンセン病を二大標的とし、40年来培われてきた日米医学協力計画における研究の蓄積も活かしながら、種々の新たな研究手法により、我国のみならずアジア諸国での新たな抗酸菌対応策の樹立に向けた基盤的研究を展開した。20年以上悩まされ続けてきた病原性抗酸菌症との戦いは、人類と抗酸菌との戦いでもある。近年確立された分子生物学・分子免疫学を駆使して、抗酸菌の性状を詳細に把握しようとする、抗酸菌の生命力の偉大さに改めて目を見張らされる場所である。しかし、最新技術を駆使した継続的努力を積み重ねることによって初めて抗酸菌の恐怖から逃れることが可能になるものと考えられる。

日本において切実な問題は、若手抗酸菌研究者の不足である。抗酸菌研究が若手研究者にとって魅力のあるものにしなければならず、また、若手研究者がアメリカ及びアジア諸国の研究者と交流する機会を与えることも極めて大切である。そうした意味において、本研究班の果たす役割は大きく、同時にアジア諸国の研究者に対して大きな刺激を与え、彼らの研究土壌が大きく、かつ確固たるものとなることを期待する。

#### E. 結論

本研究班は、日本を代表する抗酸菌研究者により組織されており、それぞれが限りある研究費の中で最大限の努力を払い、研究分担者としての自覚を持った研究が展開

された。本成果は、日本の抗酸菌研究の成果と言っても過言ではない。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

刊行一覧表の通り質の高い論文が20数本発表された。

##### 2. 学会発表

それぞれの研究者の発表は、国内では主に日本細菌学会・日本免疫学会・日本結核病学会・日本ハンセン病学会・日本感染症学会・日本生体防御学会などの総会・学術集会で発表された。国際学会では、第46回日米医学協力計画結核ハンセン病専門部会合同会議（さいたま市）において発表された。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1) 鈴木定彦、中島千絵、鈴木晴香、奥村英正、川瀬三雄、廣田寿一、丹羽孝介。標的ポリヌクレオチドの検出方法及びアレイ。平成23年6月28日、特願2011-143441、出願人；国立大学法人北海道大学、日本碍子株式会社

2) 中島千絵、鈴木定彦、福島由華里。核酸増幅方法およびその利用。平成23年3月14日、特願2011-55327、出願人；国立大学法人北海道大学

3) 特願：2011-119506

出願日：平成23年5月27日

「新規な抗酸菌生育阻害剤」

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）  
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・研究員）

研究要旨.

弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG が結核に対するワクチンとして使われてきたが、現在では成人あるいは高齢者の肺結核を予防することはできないと考えられている。これまでに結核菌と同じ抗酸菌に分類されるらい菌の感染によって発症するハンセン病の発症を抑制し得るワクチン作製にあたり、らい菌の主要抗原 Major Membrane Protein (MMP)-II を用いた改良型 BCG が有効であることを見出してきている。改良型 BCG の作製にあたっては、BCG に MMP-II 遺伝子単独あるいは HSP70-MMP-II 連結遺伝子を組み込ませる方策が有効であった。MMP-II は結核菌にも存在するため、同様に作製した BCG が結核菌に対しても有効に作用する可能性が考えられる。しかし、らい菌の MMP-II と結核菌の MMP-II とでは、アミノ酸レベルでの相同性は 90%にとどまり、結核菌の MMP-II の抗原性、特に獲得免疫応答惹起能については報告されていない。そこで、結核菌由来 MMP-II の抗原提示細胞及び CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞の活性化能を評価した。結核菌 MMP-II と BCG 由来の HSP70 を連結した融合蛋白についても同様の解析を行った。結核菌 MMP-II は、ヒト単球由来樹状細胞を活性化し IL-12 の産生を誘導するとともに、樹状細胞を介しヒトナイーブ CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を活性化しインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) の産生を誘導した。IFN- $\gamma$  産生誘導能はらい菌由来 MMP-II よりも強く、結核菌 MMP-II の強い免疫活性化能が確認できた。MMP-II と HSP70-MMP-II 融合蛋白を比較すると、後者においてより強く T 細胞を活性化した。また、MMP-II 及び融合蛋白は、ともにヒトメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化し、パーフォリン産生性キラー T 細胞を効率的に産生した。さらに、結核菌感染樹状細胞及びマクロファージは、細胞表面に MMP-II 抗原を発現したことより、これら結核菌感染抗原提示細胞は MMP-II を介し容易に殺戮されるものと推察された。結核菌のワクチン候補分子は数種類のみであったが、本研究により新しい主要抗原が同定され、結核ワクチン開発がより容易となった。

A. 研究目的

結核菌に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を中心とした獲得免疫応答により営まれており、これら T 細胞を活性化する抗原提示細胞としては樹状細胞が重要な働きを果たしている。結核に対するワクチンとして BCG が使われてきたが、その有効性は極めて限られていて、

また、ワクチン開発は数年前より大きな進展は認められておらず、新たなワクチンの開発が切望されている。ワクチン開発においては、ESAT6・Ag85complex・CFP10 等がワクチン候補分子として注目されていた。しかし、未だに絶対的信頼は勝ち得ておらず、新しい分子の探索が不可欠である。これまでに、ハンセン病に対するワクチン開

発を展開してきたが、らい菌の主要抗原として MMP-II を見出し、MMP-II は CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を有し、さらに、TLR2 に結合することから、ファゴゾームの内膜や細胞表面に発現した TLR2 を刺激し、宿主細胞の NF- $\kappa$ B を活性化し、その結果、樹状細胞を活性化することが可能であった。また、MMP-II 遺伝子に結核菌由来の分泌シグナルあるいは BCG 菌由来の HSP70 遺伝子を連結して BCG に組み込んでリコンビナント BCG を作製すると、親 BCG に比し有意に強くらい菌の生体内での増殖を抑制することが可能であった。らい菌と同じ抗酸菌に分類される結核菌の増殖も同様な方策で抑制できる可能性があると考えられるが、結核菌由来の MMP-II については、未知であって、T 細胞活性化能も検討されていない。そこで、結核菌由来の MMP-II 及び MMP-II と HSP70 を連結した HSP70-MMP-II 融合蛋白について、T 細胞及び抗原提示細胞活性化能を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

非病原性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に結核菌由来 MMP-II 遺伝子あるいは HSP70-MMP-II 遺伝子を導入し、リコンビナント蛋白を作製し、アフィニティークラムを用いて蛋白を精製した。得られたリコンビナント蛋白は LPS を含有していなかった。正常健常人末梢血より、CD3 抗体付着ビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得て樹状細胞及びマクロファージのプレカーサーとして用いた。得られた単球にリコンビナント (r) GM-CSF および rIL-4 を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、精製蛋白をパルスし、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。樹状細胞の T 細胞活性化能は、抗原パルスした樹状細胞をマイトマイシン C で処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法

で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製し、ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用いた。IFN- $\gamma$  および IL-2 は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。抗原添加における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞表面を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて測定した。抗体は市販の抗体を用いた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

## C. 研究結果

結核菌由来の MMP-II (MMP-II (MTB)) と本 MMP-II と BCG 由来の HSP70 の融合蛋白 (Fusion (MTB)) を用いて樹状細胞を刺激すると、樹状細胞表面の MHC 抗原、CD86・CD83 抗原の発現が上昇した。両者を比較すると Fusion (MTB) が、MMP-II 抗原に比しより強く発現を誘導した。MMP-II (MTB) 及び Fusion (MTB) で樹状細胞を刺激すると IL-12p40 の産生が誘導され、さらに、刺激直前に樹状細胞表面を TLR2 に対する抗体で処理すると IL-12 の産生は有意に低下した。本現象は、検索した全ての蛋白で確認された。また、サイトカイン産生能は Fusion (MTB) が MMP-II (MTB) に比し強かった。樹状細胞に精製蛋白をパルスし、抗原提示細

胞として用いると、ヒト末梢 CD4 陽性 T 細胞を非常に強く活性化した。その際にも Fusion (MTB) が有意に強く T 細胞を活性化し、極めて少量の抗原で強く T 細胞を活性化することが可能であった。このことは、BCG ワクチンにより CD4 陽性 T 細胞は生体内で MMP-II 抗原により感作されている可能性を示唆している。さらに、末梢単球由来マクロファージを介してもヒト CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。両リコンビナント蛋白は未感作 CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能で、とりわけ Fusion (MTB) は、大量の IFN- $\gamma$  の産生を誘導することが可能であった。さらに、らい菌由来 MMP-II を用いて作製した HSP70-MMP-II 融合蛋白 (Fusion (ML)) と Fusion (MTB) を比較すると、後者がより強く T 細胞を活性化した。Fusion (MTB) によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞の活性化は、抗原特異的であって、抗原パルス樹状細胞の表面を MHC class II あるいは CD86 抗原に対する中和抗体で処理することで、T 細胞の活性化は有意に抑制された。また、MMP-II に対する抗体を用いても、T 細胞の活性化は抑制された。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化はパルスした MMP-II に依存した反応であることが判明した。MMP-II (MTB) ・ Fusion (MTB) は樹状細胞を介してヒトメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞をも活性化した。MMP-II (ML) ・ MMP-II (MTB) ・ Fusion (ML) ・ Fusion (MTB) の 4 種を比較すると、Fusion (MTB) が最も強く未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化した。さらに、抗原パルスした樹状細胞を CD40 リガンドを用いて再刺激すると、CD8 陽性 T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生量は増大した。Fusion (MTB) による未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化も抗原特異的反応であった。MMP-II (MTB) ・ Fusion (MTB) は、CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性のキラー T 細胞を産生した。また、結核菌 H37Ra 及び H37Rv を樹状細胞及びマクロファージに感染させると細胞表面に MMP-II が発現した。アジアへの貢献について：  
ハンセン病の早期診断法について、MMP-II

に着目して血清診断法を開発してきた。抗 MMP-II 抗体は、従来用いられてきた PGL-I に対する抗体を測定する系に比し高い感度を有し、多菌型では 80~90%、少菌型ハンセン病では 40~50% の患者を同定することを可能とした。本年は、少菌型ハンセン病患者の感度を高めるため MMP-I に着目し、日本人保存血清を用いてパイロットスタディを実施した。その結果、MMP-I と MMP-II を混在させた抗原を用いるとより感度が高くなることが判明した。

#### D. 考察

BCG がワクチンとして充分効果を発揮できない最大の原因は、BCG が抗原提示細胞に取り込まれた際ファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止することにある。そのため、BCG 由来の T 細胞活性化に寄与し得る抗原分子は抗原提示細胞の表面に発現されず、T 細胞の抗原特異的活性化が誘導されない。同時に、BCG 由来の抗原が細胞質に分泌されないため、未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化することは極めて難しい。BCG のこの欠点を凌駕するためには、感染した細胞のファゴゾームの中で主要抗原を分泌させ、分泌された蛋白をライソゾーム及び細胞質へ移動させることが必要である。さらに、免疫原性に富んだより有効に作用し得る主要抗原を細胞質等へ移動させる必要がある。そのため、ワクチン開発に当たっては、抗原性に富んだ主要抗原をまず同定することが極めて重要である。この点において、結核菌由来 MMP-II 及び HSP70 との融合蛋白は、TLR2 を介し樹状細胞を活性化する能力を有し、未感作の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を持っていたことから、主要抗原としての役割を果たすことが充分期待できる。また、BCG ワクチン接種を受けた日本人正常健常者のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞は MMP-II 抗原により感作されている可能性が考えられた。さらに、結核菌を樹状細胞やマクロファージに感染させると、その細胞表面に MMP-II 抗原が発現したことから、MMP-II はヒト生体内で T 細胞により認

識され得る蛋白であることが示され、さらに結核菌感染を受けた抗原提示細胞はヒト CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し得る可能性があることを示唆している。

また、これまでのハンセン病に対するワクチン開発研究において、MMP-II または HSP70-MMP-II 融合蛋白を BCG に組み込ませたリコンビナント BCG は、親 BCG に比し有意に強くらい菌の増殖を抑制することを見出している。したがって、結核菌由来 MMP-II は結核に対するワクチンとして極めて有用な役割を果たすことが可能と期待される。

#### E. 結論

結核菌由来 MMP-II 蛋白は抗原性の強い分子であり、樹状細胞及びヒト CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞を強く活性化した。MMP-II は、結核ワクチンの開発に有効な役割を果たすものと期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, in press.
- 2) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.
- 3) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *foIP1* gene and Dapsone resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 762-766.

##### 2. 学会発表

- 1) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a

T-bet-independent manner. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 2) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. 51<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
- 3) Maeda, Y., T. Tamura, M. kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 4) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 5) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of Mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent-*Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from

- Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 8) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 9) Makino, M., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and T. Mukai. Naïve T cell activation by urease-deficient recombinant BCG that produces HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 10) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 11) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 12) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 13) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 14) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 15) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011,

- Saitama, Japan.
- 16) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, N. Ishii, and M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980-2010. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 17) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦. 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
  - 18) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
  - 19) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
  - 20) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 培養可能抗酸菌を利用したらい菌リファンピシン耐性変異の解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山
  - 21) 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. 日本のブルーリ潰瘍: 確定診断のための検査に関する検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 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23年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

光山 正雄

(京都大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

抗酸菌の病原性と免疫誘導機構

研究分担者 光山 正雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・教授）  
研究協力者 河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）

研究要旨.

結核菌が産生する proline-proline-glutamic acid (PPE) ファミリータンパク質のうち、PPE37 遺伝子の発現はマクロファージに食食後に増加することや、肺に感染した結核菌でこの PPE37 の発現が著しく高まることから、PPE37 が菌の細胞内寄生や宿主応答の制御に関与する可能性が考えられる。そこで、結核菌 PPE37 を発現する *M. smegmatis* 株 (*Ms\_ppe37*) を作製し、*in vitro* でマクロファージに感染させてマクロファージ機能に対する PPE37 の作用を調べた。その結果、*Ms\_ppe37* とベクターのみをトランスフェクトした *M. smegmatis* 株 (*Ms\_vec*) の間で細胞内生存率や、マクロファージの細胞死誘導能に違いが認められなかった。また、PPE37 を発現しても *M. smegmatis* 感染で誘導されるマクロファージ表面の class I、class II、CD80、CD86 および CD40 発現レベルに影響しないことが明らかになった。しかし、感染後に誘導される炎症性サイトカイン産生応答を調べたところ、*Ms\_ppe37* を感染させると、*Ms\_vec* を感染させた場合よりも TNF- $\alpha$  および IL-6 の転写が遅延し、それらサイトカインの産生レベルが有意に低下することが示された。また、*Ms\_ppe37* 感染では NF- $\kappa$ B、ERK および p38 のリン酸化が明らかに減弱することが示された。以上の結果から、PPE37 は感染マクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することで菌の病原性に関与することが示された。

結核菌の病原性には RD1 遺伝子領域が重要な役割を果たしていることが示されている。これまでの研究から、RD1 は結核菌感染マクロファージの細胞質内カリウムイオンの流出を促すことで caspase-1 の活性化を誘導し、IL-1 $\beta$  および IL-18 産生に関与することが示されている。今回、RD1 欠損株 ( $\Delta$  RD1) の IL-1 $\alpha$  産生誘導能が親株 (H37Rv) に比較して明らかに弱いことから、RD1 が IL-1 $\alpha$  産生にも関与することが明らかになった。そこで、その機序について解析を行った。その結果、 $\Delta$  RD1 の感染では培養上清中に IL-1 $\alpha$  の産生は見られないが、細胞内では IL-1 $\alpha$  の転写が起こり、proIL-1 $\alpha$  が合成されていることが示された。しかし、 $\Delta$  RD1 感染ではカルパインの活性化が誘導されないため、IL-1 $\alpha$  が分泌されないことが示された。さらに解析を進めたところ、 $\Delta$  RD1 感染ではカルパイン活性化に必要な細胞内カルシウムイオンの流入が起こらないことが明らかとなった。これらの結果から、RD1 は感染マクロファージのカルシウムイオンの流入に関与し、その結果活性化されたカルパインが IL-1 $\alpha$  の成熟化と分泌を誘導することが示された。

A. 研究目的 諸国の中では比較的高く、低蔓延状態が持続している。また、抗結核剤の使用は超多  
現在、我が国における結核の発症率は先進