

剤耐性菌を出現させ、高齢化社会の到来と社会のグローバル化に伴う国際的な人的交流が、治療困難な結核症の流行の引き金を引く可能性がある。結核菌は宿主に感染後、主にマクロファージに取り込まれるが、常在性マクロファージでは殺菌処理することができない。また、結核菌感染後には防御免疫が発現するが、その場合でも菌は容易には排除されない。このように結核菌は宿主感染防御に対して強い抵抗性を示すが、その一方で結核による死亡率はそれほど高くない。これは結核菌がヒトを自然宿主とすることに成功を収めたことを意味しており、菌は感染後長期間に亘り宿主体内で生存し続ける。結核に対する新たな治療や予防戦略を構築するためには、菌が有する宿主感染防御に対する抵抗性と、それに対する宿主応答機序を分子レベルで明らかにすることが重要となる。

結核菌はその病原性に係わる様々な因子を産生する。それらはマクロファージの細胞内殺菌能や、サイトカイン産生応答を修飾することで宿主感染防御を制御し、結核菌が宿主体内で長期生存することを可能にしている。しかし、その詳細な機序について明らかにされているものはほとんどない。PPE ファミリータンパク質はその N 末端領域に保存された PPE モチーフを有し、その多くが病原性の強い抗酸菌に発現することが示されている。これら PPE ファミリータンパク質のうち PPE37 遺伝子はマクロファージに感染後や、肺に感染した結核菌でその発現が著明に増加することや、その発現は IdeR 転写制御因子による制御を受けており、鉄イオン濃度の少ない食胞内でその発現が増加することが示されている。これらの結果は、PPE37 が菌の病原性に関与することを示唆するものである。そこで本研究では、PPE37 がマクロファージ機能に及ぼす影響を調べた。

また、結核菌の RD1 遺伝子領域は、結核菌の ESX1 分泌装置および分泌因子をコードする領域で、菌の病原性、感染細胞のネクロシスやアポトーシス誘導および肉芽腫形成などに関与することが知られている。

さらにこれまでの研究から、RD1 はサイトカイン産生応答にも重要で、RD1 が細胞質からカリウムイオンの流出を促すことで caspase-1 が活性化され、IL-1 β や IL-18 産生が誘導されることが示されている。この結果は、マクロファージのサイトカイン産生が結核菌病原因子によって刺激されることを示しており、感染防御における重要な宿主-寄生体相互関係の 1 つと捉えることができる。今回、この RD1 が IL-1 α 産生誘導にも関与することを見出したので、その機序について解析を行った。

B. 研究方法

1. マクロファージ機能に及ぼす PPE37 の作用

PPE37 産生性 *M. smegmatis* 株の作製

結核菌 H37Rv よりゲノム DNA を回収し、PCR 法により *ppe37* 遺伝子を増幅した。この *ppe37* 遺伝子の 5' 末端に 6 x His 遺伝子を付加し、pMV261 発現ベクター上の hsp プロモーターの下流に組み込んだ。エレクトロポレーションによりこの組換えベクターを *M. smegmatis* mc²155 に導入し、PPE37 産生株 (*Ms_ppe37*) を得た。また、pMV261 ベクターのみをトランスフェクトした株 (*Ms_vec*) を対照株として実験に用いた。

In vitro 感染実験

C57BL/6 マウスの腹腔滲出マクロファージに各種組換え体を感染させ、経時的に菌数、サイトカイン産生量および培養上清中の LDH 活性を測定した。また、各種 *M. smegmatis* 株を感染後、経時的に cell lysate を調製し、NF- κ B、ERK および p38 の活性化レベルを解析した。

2. IL-1 α 産生に及ぼす結核菌 RD1 遺伝子領域の影響

In vitro 感染実験とサイトカイン産生

C57BL/6 マウスの腹腔滲出マクロファージに結核菌 H37Rv、RD1 領域欠損株 (Δ RD1) および RD1 相補株 (Δ RD1::RD1) を感染させ、IL-1 α mRNA 発現量を RT-PCR で経時的に解析した。また、結核菌感染後経時的に培養上清および cell lysate を回収し、それら

に含まれる各種炎症性サイトカイン量を ELISA で測定した。さらに、カルシウムキレーターやカルパイン阻害剤存在下で菌をマクロファージに感染させた場合の IL-1 α 産生量を調べた。

カルパインの活性化と細胞内カルシウム濃度の測定

結核菌感染マクロファージのカルパイン活性化レベルを調べるため、結核菌感染後に cell lysate を調製し、カルパインの細胞内基質である α -fodrin の分解産物量を Western blotting により測定した。また、結核菌感染後のマクロファージ細胞質内カルシウム濃度は fluo-4 calcium assay kit を用いて測定した。

倫理面への配慮 本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

1. マクロファージのサイトカイン産生応答に及ぼす PPE37 の効果

PPE37 を発現する *M. smegmatis* (*Ms_ppe37*) と vector のみをトランスフェクトした対照株 (*Ms_vec*) をマクロファージに感染させ、PPE37 の効果を解析した。マクロファージに感染後、両菌株の細胞内菌数を経時的に測定したが、有意な差は認められなかった。また、病原性の高い結核菌はマクロファージのネクロシスを誘導することが知られている。そこで、*Ms_ppe37* と *Ms_vec* をマクロファージに感染させ、その後の細胞死の程度を細胞質に局在する LDH の培養上清への遊離量で解析した。しかし、*Ms_ppe37* を感染させても、遊離する LDH 量に違いは認められなかった。さらに、感染後のマクロファージ活性化の指標として、細胞表面抗原の発現量を比較した。ここでは MHC class I および class II 抗原、CD80、CD86 と CD40 の発現量を調べたが、*Ms_ppe37* と *Ms_vec* 感染後の各抗原の発現量に違いは認められなかった。一方、感染後の炎症性サイトカイン産生のレベルを比較したところ、*Ms_vec* 感染では強い TNF- α 、IL-6、IL-12p70 および IL-1 β 産生が誘導さ

れたが、*Ms_ppe37* 感染ではいずれのサイトカイン産生量も有意に低いことが示された。TNF- α および IL-6 の mRNA 発現量を調べたところ、*Ms_vec* 感染では、TNF- α mRNA の発現は感染 3 時間後より、IL-6 mRNA は感染 12 時間後より強い発現が誘導された。一方、*Ms_ppe37* 感染ではそれらサイトカイン mRNA の発現の明らかな遅延が認められた。さらに、サイトカイン産生誘導に必要な転写因子およびシグナル伝達因子の活性化レベルを比較したところ、*Ms_vec* 感染で誘導される NF- κ B、ERK および p38 の活性化レベルに比べて *Ms_ppe37* 感染で誘導されるこれら因子の活性化レベルは低いことが明らかとなった。これらの結果から、PPE37 は感染マクロファージのサイトカイン産生を制御する活性を有することが示された。

2. IL-1 α 産生誘導における RD1 の関与

結核菌をマクロファージに感染させると強い IL-1 α の産生が誘導された。しかし、 Δ RD1 感染では IL-12p40 産生は同程度に認められたが、IL-1 α 産生は著しく低いことが示された。IL-1 α は proform の形で合成された後、成熟化して培養上清中に産生される。そこで、RD1 が IL-1 α 産生にどのように関与するのかを明らかにするため、H37Rv と Δ RD1 感染後、proform および mature IL-1 α 産生量を経時的に調べた。その結果、 Δ RD1 感染でも H37Rv 感染の場合と同程度に proIL-1 α 産生は誘導されることが示された。この結果から、RD1 は IL-1 α の成熟化およびその分泌に関与することが明らかとなった。これまでの研究で、IL-1 α の成熟化にはカルパインが関与することが示されている。そこで、結核菌感染で誘導される IL-1 α 産生にもカルパインが関与するか否かを明らかにするため、各種阻害剤存在下で H37Rv をマクロファージに感染させ、IL-1 α 産生量を調べた。その結果、H37Rv 感染後の IL-1 α 産生はカルシウムキレーターやカルパイン阻害剤で著明に抑制されることが示された。また、 Δ RD1 感染ではカルパインの活性化が誘導されないことが明らかとなった。以上の結果から、結核菌感染で誘導される

IL-1 α 産生には、カルパインが重要であり、その活性化は RD1 に依存して誘導されることが示された。カルパインはカルシウム依存的なプロテアーゼであり、その活性化は細胞内カルシウム濃度に依存して誘導される。そこで、H37Rv および Δ RD1 をマクロファージに感染させた場合の細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。その結果、H37Rv 感染ではカルシウム濃度の上昇が認められたが、 Δ RD1 感染では認められなかった。また、 Δ RD1 を感染させたマクロファージにカルシウムイオノフォアを作用させて細胞内カルシウム濃度を上昇させると、IL-1 α 産生が誘導された。これらの結果から、結核菌感染マクロファージでは RD1 は細胞内カルシウムの流入を介してカルパインを活性化することで IL-1 α 産生に関与することが明らかとなった。

尚本研究の遂行に当たり、マレーシアからの留学生の Sylvia Daim および中国からの留学生である楊瑞麗と陳曦の協力は不可欠であった。本研究を通して習得した感染防御免疫に関する知識や実験手技は、留学生が今後本国に帰国した後も、研究を遂行する上で必ず役立つものと確信している。

D. 考察

結核菌は宿主免疫応答を制御して長期間に渡り宿主体内で生存し続ける。特に、宿主細胞となるマクロファージの機能を制御する機序は結核菌の潜伏感染を成立させるために重要になると考えられる。これまでに結核菌の病原性に係わる多くの因子が明らかにされてきた。その中で、病原因子としての機能が明らかにされたものは今のところそれほど多くはないが、これら結核菌因子の機能の総和が菌の強い抵抗性を規定することは間違いない。ヒトを自然宿主とする結核菌を排除するためには、これら因子の機能を明らかにしていかなければならない。

本研究結果から、PPE37 はマクロファージの NF- κ B、ERK や p38 の活性化を抑制することで感染後に誘導される炎症性サイトカイン産生を制御する活性を担っていること

が示された。PPE37 によるサイトカイン産生の抑制機序は今のところ明らかではないが、コンピュータを用いた構造解析から、PPE37 は膜タンパク質であること示唆されている。従って、PPE37 による抑制効果は、PPE37 がマクロファージ上の抑制性レセプターを刺激した結果である可能性がある。あるいは、PPE37 が *M. smegmatis* が有するリガンドと pattern recognition receptor との反応を阻害することがその原因であると考えられる。PPE37 による抑制効果の分子機序を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。

結核菌の病原性に重要な遺伝子領域である RD1 には結核菌の分泌装置 (ESX1) がコードされており、この分泌装置を介して分泌される結核菌因子が菌の病原性に重要な役割を果たすものと考えられている。これまでに 10 種類以上の結核菌因子が ESX1 を介して分泌されることが報告されている。それらのうち、ESAT-6 は膜傷害性や、細胞死の誘導に関与すること。また、Toll like receptor 2 のリガンドであることが示されている。今後、ESAT-6 を含めどのような因子が菌の感染後に見られるカルシウムの流入を引き起こし、カルパインの活性化と IL-1 α 産生を誘導するのかを明らかにしていく予定である。

E. 結論

本研究では、結核菌の病原因子がマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。PPE37 は NF- κ B、ERK および p38 の活性化を抑制することでサイトカイン産生の制御に関与することが明らかとなった。病原性の強い結核菌は宿主防御に重要な TNF- α 産生誘導能が低いことが示されており、PPE37 はこのサイトカイン産生を抑えることで菌の病原性に関与することが示唆された。また、RD1 は IL-1 α の転写には関与しないが、その後の IL-1 α の成熟化と分泌の誘導に必要なことが示された。これは、RD1 を介する菌の病原性メカニズムに対するマクロファージの応答と捉えることができ、その結果として、カルシウムの流

入を介したカルパインの活性化だけでなくカリウムイオンの流出を介してインフラマソームの活性化が誘導され、IL-1 α およびIL-1 β や IL-18 産生が惹起されるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daim, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Kurenuma, Y. Shen, S. R. Dewamitta, S. Sakai, T. Nomura, H. Qu, and M. Mitsuyama. 2011. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. J. Med. Microbiol., 60: 582-591.

2. 学会発表

- 1) 河村伊久雄. 結核菌の病原性と宿主免疫応答. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 4 月 東京
- 2) 河村伊久雄, 陳¹, 酒井俊介, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの IL-1 α 産生における RD1 遺伝子領域の役割. 第 81 回実験結核研究会 2011 年 6 月 東京
- 3) 河村伊久雄, 酒井俊介, 土屋晃介, 原英樹, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの interleukin-1 α 産生における RD1 遺伝子領域の重要性. 第 22 回日本生体防御学会学術総会 2011 年 6 月 沖縄
- 4) Kawamura, I., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, and M. Mitsuyama. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to

secretion of IL-1 α from infected macrophages through the induction of calcium influx. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6- 10 September, 2011, Hokkaido, Japan.

- 5) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. PD-1 regulates the balance between protective and pathologic immune responses during murine tuberculosis. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6- 10 September, 2011, Hokkaido, Japan.
- 6) Daim, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Yamamoto, H. Qu, and M. Mitsuyama. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会 2011 年 11 月 大阪
- 7) Kawamura, I., C. Xi, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, M. Mitsuyama. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to secretion of IL-1 α from infected macrophages through the induction of calcium influx. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 千葉

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)

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

分担研究報告書

研究分担者

吉開 泰信

(九州大学・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

抗酸菌感染における免疫防御誘導機構

研究分担者 吉開 泰信（九州大学生体防御医学研究所・教授）

研究要旨.

IL-17 は T 細胞由来炎症性サイトカインであり、近年 IL-17 産生 CD4 ヘルパー T 細胞サブセット (Th17) が自己免疫疾患に直接関与することが明らかとなり注目を浴びている。一方、正常な個体において存在する IL-17 産生細胞は主に $\gamma\delta$ T 細胞であり、肺、腹腔、腸管粘膜などの末梢組織に多く存在する。我々は *Mycobacterium bovis* BCG 感染マウスモデルを用いた研究において、気道感染では肺で、 $\gamma\delta$ 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を明らかにした。さらに IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は胎生期胸腺ですでに機能分化しており、胸腺上皮細胞の発現する Delta-like 4 と T 細胞前駆細胞に発現される Notch1 からのシグナルで誘導される HES1 と IL-7 レセプター α が IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の胸腺における機能分化と末梢組織での維持に必須の分子であることが明らかとなった。また、感染早期では MyD88 依存性に IL-23 が産生されることが、 $\gamma\delta$ T 細胞の IL-17 産生に必須であることが明らかになった。

A. 研究目的

正常な個体において存在する IL-17 産生細胞は主に $\gamma\delta$ T 細胞であり、我々は腹腔内感染マウスモデルを用いた研究において腹腔内常在性 $\gamma\delta$ 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で感染初期防御に関与していること、IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺において機能分化を果たしていることが明らかとなった。さらに膀胱癌の BCG 療法において抗腫瘍効果に BCG で活性化された IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が担っていることを見い出した。今回は、Notch1 からのシグナルで誘導される IL-7 レセプター (IL-7R) α の IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の肺で維持機構の役割と IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の肺で活性化機構について解析した。

B. 研究方法

IL-17A^{-/-}, C8^{-/-}, TLR2^{-/-}, MyD88^{-/-}, Tyk2^{-/-}, CARD9^{-/-}マウス(それぞれ東京大学医科学研究所岩倉洋一郎先生、理化学研究

所糸原重美先生、大阪大学審良静男先生、宮崎大学下田和哉先生、佐賀大学原博満先生より供与)を用いた。T 細胞のサイトカイン産生は PMA/ Ionomycin 刺激後、細胞内染色法によりフローサイトメーター (FACS) で解析した。V γ 6/J γ 1/C γ 1 鎖遺伝子を pCAGGS vector (大阪大学宮崎純一先生より供与) にクローニング後 V γ 6/J γ 1/C γ 1 鎖トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、IL-7R α 欠損マウス (京都大学生田宏一先生より供与) と交配させた。In vitro での末梢 $\gamma\delta$ T 細胞の機能維持における Notch シグナルと IL-7 の役割を解析するため、C β KO マウスの脾臓から $\gamma\delta$ T 細胞を分離・精製後、Notch リガンドの一つである Delta-like 4 を強制発現させたストローマ細胞 TSt-4/ DLL4 (理研河本宏先生より供与) 上に播種し、異なる濃度の IL-7 を添加後 4 日間培養した。in vivo での好中球欠損には抗 Gr-1 抗体を用いた。肺のサイトカイン産生は ELISA、細胞浸潤はフローサイトメトリーを用いて解析した。

C. 研究結果

1) 感染早期での IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化機構

感染後の好中球浸潤と IL-17A の産生は感染 1 日目に肺においてピークを迎えた。IL-17A^{-/-}マウスでは WT マウスに比べて、肺での好中球浸潤と菌の排除が障害されていた。IL-17A は主に $\gamma\delta$ T 細胞より産生されていた。C δ ^{-/-}マウスでは IL-17A 産生と好中球浸潤の障害を認めた。 $\gamma\delta$ T 細胞からの IL-17A 産生は、 $\gamma\delta$ T 細胞自身による抗原の認識によるものではなく炎症局所において産生される IL-23 により誘導された。IL-23 は C-type lectin receptor (CLR) タイプレクチンレセプター経路に必須の分子である CARD9 欠損下でも野生型とほぼ同程度認められたが、Toll-like receptor (TLR) 経路に必須の分子である MyD88 欠損下では著明な低下を認めた。さらに TLR2 が感染後の IL-23 誘導に関与しており、実際 TLR2^{-/-}マウスでは IL-17A 産生・好中球浸潤・菌の排除が WT マウスに比べて障害されていた。自然発生 IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が TLR2 を介して産生される IL-23 に反応して IL-17A を産生することで好中球浸潤を誘導し感染初期防御に関わることが明らかとなった。

2) IL-17 産生 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の分化機構

Notch シグナルの下流にある IL-7R α の IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞分化における役割を明らかにするため、マウス胎児胸腺より T 細胞前駆細胞を回収後、Notch リガンドの一つであり T 細胞初期分化に必須の分子である Delta-like 4 発現胎児胸腺由来分化支持細胞 TSt4 を用いて 2 週間培養した。その結果、Notch シグナルの有無に関わらず T 細胞前駆細胞より $\gamma\delta$ T 細胞の分化は認められたが、Notch シグナル存在下においてのみ有意な Hes1 と IL-7R α の発現上昇と IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞分化が誘導された。次に Notch シグナルを過剰発現させた胎児肝細胞を骨髓照射したマウスに移入し胸腺における $\gamma\delta$ T 細胞の機能を解析した結果、Hes⁻¹ と IL7-R α の発現上昇と IL-17 産生細

胞の割合の増加を認めた。胸腺および肺での $\gamma\delta$ T 細胞の IL-7R α の発現を FACS で解析した結果、IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T 細胞よりも IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞において高かった。IL-7R α 欠損 V γ 6/J γ 1/C γ 1 鎖マウスの adult の胸腺と肺において IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の割合は変わらなかったが IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の割合が顕著に減少した。

D. 考察

Notch シグナルが IL7-R α の発現に関与していることが確認できた。さらに IL-7-R α は IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の胸腺内機能分化と肺などの組織における維持に関わっていることが明らかとなった。感染マウスモデルを用いた肺の解析により、肺の自然発生 IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が TLR2 を介して産生される IL-23 に反応して IL-17A を産生することで好中球浸潤を誘導し感染初期防御に関わることが明らかとなった。今後、IL-7 の結核感染防機構の役割について検討する予定である。

E. 結論

感染マウスモデルを用いた解析により、肺における自然発生 IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が TLR2 を介して産生される IL-23 に反応して IL-17A を産生することで好中球浸潤を誘導し感染初期防御に関わることが明らかとなった。さらに常在性 IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は胎生期胸腺ですでに機能分化しており、特異的に Notch1, IL7Ra, HES1 を高く発現しており、遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの解析により、肺での自然発生 IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の維持に IL-7Ra が必須の分子であることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi, A., T. Dejima, H. Yamada, K. Shibata, R. Nakamura, M. Eto, T. Nakatani, S. Naito, and Y. Yoshikai. 2011. IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells is important for the antitumor effect of Mycobacterium bovis

bacillus Calmette-Guérin treatment against bladder cancer. Eur. J. Immunol., 41: 246-251.

- 2) Shibata, K., H. Yamada, T. Sato, S. Dejima, M. Nakamura, T. Ikawa, H. Hara, S. Yamasaki, R. Kageyama, Y. Iwakura, H. Kawamoto, H. Toh, and Y. Yoshikai. 2011. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. Blood, 118: 586-593.

2. 学会発表

- 1) 中村真隆、柴田健輔、山田久方、吉開泰信. IL-7 による自然発生 IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞機能制御機構の解析. 第 22 回日本生体防御学会学術総会

6. 29. 2011

- 2) 出嶋卓、柴田健輔、山田久方、吉開泰信. Candida albicans 感染防御における自然発生 IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の役割. 第 22 回日本生体防御学会学術総会 6. 29. 2011
- 3) 柴田健輔、山田久方、吉開泰信. Notch-Hes1 経路は自然発生 IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞分化に必要である. 第 22 回日本生体防御学会学術総会 6. 29. 2011

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)

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

分担研究報告書

研究分担者

鈴木 定彦

(北海道大学・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研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

研究分担者 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）

研究協力者 中島 千絵（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教）

研究要旨

従来から用いられてきているスポリゴタイピング法は結核菌の遺伝子型別に有用である。この方法は先進国では汎用されているが、一度に多くの検体を処理する必要がある事、操作が煩雑である事と、市販キットが高価である事が問題となり、アジア・アフリカの発展途上国ではほとんど使用されていない。本研究では、スポリゴタイピングのターゲットである直列反復配列領域に存在するスペーサー配列からなるオリゴヌクレオチドをナイロンメンブレン基材にプリントした微小オリゴヌクレオチドアレイを試製し、これに対して直列反復配列領域の遺伝子増幅産物をハイブリダイズさせることによる遺伝子型別法を確立した。本研究で開発したスポリゴアレイについて、フィリピン・STD-AIDS cooperative Central Laboratory、タイ・National Institute of Health、ミャンマー・Department of Medical Research, Lower Myanmar およびネパール・National Tuberculosis Control Program の研究者に技術移転するとともに、現地での実地評価を開始した。また、本法を中国・黒竜江省の多剤耐性結核菌の遺伝子型別に活用した。本法の普及によりアジア地域の国々が独自に結核の分子疫学解析を実施する事が可能となるものと考えられる。

A. 研究目的

結核菌による感染事例が、同一原因による集団感染か、偶発的な散発事例であるかを調査するためには、遺伝子型別法は有効な手段である。また、特定の遺伝子型を持った結核菌に多剤耐性菌が多く見られる事からも遺伝子型別は重要である。遺伝子型別法のうち結核菌のゲノム上に存在する直列反復配列領域に存在するスペーサー配列の多型を分析する方法はスポリゴタイピングと呼ばれ、デジタル化データとして遺伝子が得られる事から先進国では汎用されている。得られた遺伝子型はデータベースに格納されているため、簡単にアクセスでき

る点で優れている。しかしながらスポリゴタイピング法は、一度に多くの検体を処理する必要がある事、操作が煩雑であり特殊な装置を必要とする事、入手可能な市販のキットが高価である事の3点から、アジア・アフリカの発展途上国での使用は限定的である。

本研究では、スポリゴタイピング法を迅速・簡便かつ安価な遺伝子型別法として開発し、アジア・アフリカの発展途上国への普及を目指して研究を進めた。

B. 研究方法

対象菌株

Mycobacterium bovis BCG 172 株、*M. tuberculosis* H37Rv、*M. tuberculosis* 臨床分離株を対象とした。DNA はビーズ破壊法で抽出して用いた。

スポリゴアレイの作出

直列反復配列領域に存在するスペーサー領域（図 1）の配列を参考にしてオリゴヌクレオチドを合成した。

合成したオリゴヌクレオチドは日本ガイシ株式会社に依頼してナイロンメンブレン上にプリントし、スポリゴアレイとした（図 2）。

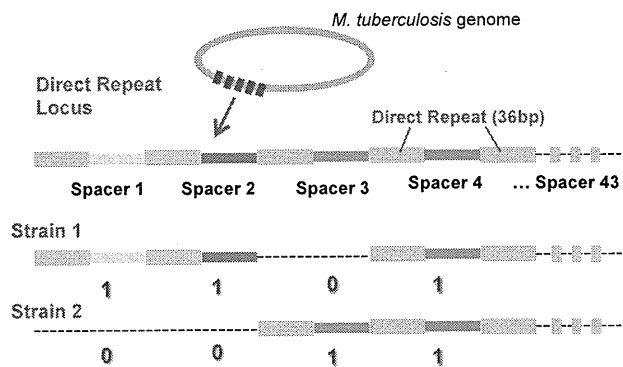


図1. 直列反復配列領域の構造と菌株の鑑別
結核菌のゲノム上に1カ所直列反復配列領域と呼ばれる領域が存在する。この領域はDirect Repeat（直列反復配列）とSpacer（スペーサー配列）から構成されている。直列反復配列は全て酷似しているが、スペーサー配列がそれぞれ異なっている。直列反復配列とスペーサー配列の存在様式が菌株ごとに異なっているため、特定のスペーサー配列の有無を調べる事により、菌株の鑑別が可能となる。

PCR 法により得られた増幅産物をプローブとしてハイブリダイゼーションを繰り返し、より均一な陽性スポット濃度が得られる様にプリントするオリゴヌクレオチドの濃度を調整した。

プローブの合成

PCR 法：*M. tuberculosis* の Direct Repeat 上にプライマーDRa：GGTTTGGGTCTGACGAC および DRb：CCGAGAGGGGACGGAAAC を設定し、これを用いてサーマルサイクラーを用いた PCR 反応によりスペーサー配列を増幅させプローブとした。PCR は通常の溶液組成にジゴケシゲニン標識デオキシ UTP を加えて、プレヒート 94℃ 5 分の後、変性 94℃10 秒、アニーリング 55℃10 秒、DNA 合成 72℃60 秒を1サイクルとして 35 回サイクルの増幅

反応により実施した。また、被検 DNA の濃度も変えて実施した。

TRIAmp 法：PCR に用いたものと同じのプライマーを用いた。反応液組成として、20mM Tris-HCl (pH8.8)、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Tween 20、0.5M betaine、0.36mM dNTP、6mM Mg₂SO₄、8U Bst polymerase および 1.6 μM primer を用いた。標識のために反応液にジゴケシゲニン標識デオキシ UTP を加えた。反応は等温で 67℃60 分間実施した。また、被検 DNA の濃度も変えて実施した。

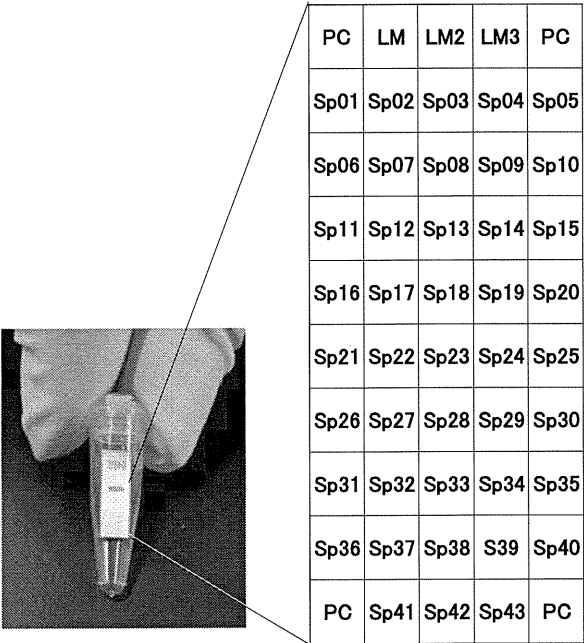


図2. スポリゴアレイの配置
PC；陽性コントロール、LM；色調比較用ランドマーク、Sp01～ 43；スペーサーオリゴヌクレオチド

ハイブリダイゼーションとデータ取得

上記 2 法により得られたプローブを DNA マイクロアレイに対してハイブリダイズさせた。ペルオキシダーゼ標識抗ジゴケシゲニン抗体を反応させた後、TMB メンブレンサブストレイトにて検出を行なった（図 3）。得られた結果はコンピュータに接続した OA 用スキャナーにてコンピュータに取り込み解析した。

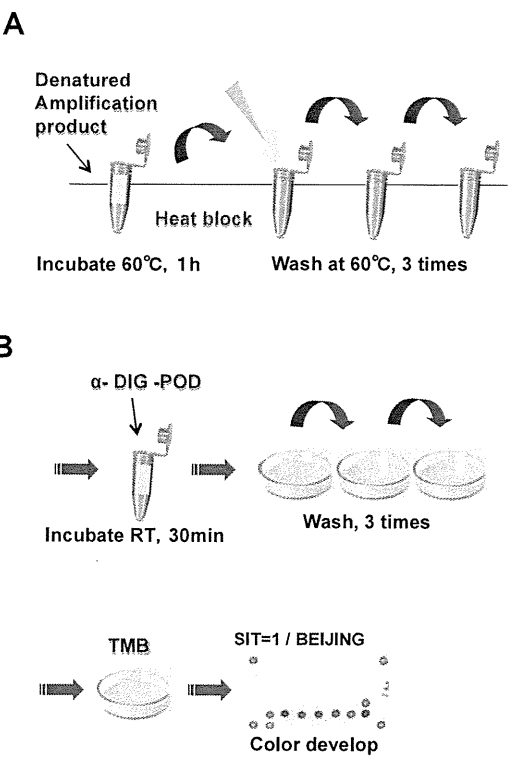


図3. スポリゴアレイの操作法
A) 恒温水槽あるいはアルミブロックインキュベーターを用いる操作;ハイブリダイゼーション(1時間)および洗浄(1分間3回)、B) 室温で実施する操作;ペルオキシダーゼ標識抗ジコケンゲン抗体の反応(30分)、洗浄(1分間3回)および発色反応(5分間)

C. 研究結果

スポリゴアレイの作出と最適化

PCR 法により得られた増幅産物をプローブとして種々の条件でハイブリダイゼーションを実施し、最も均一な陽性スポット濃度が得られる様にプリントするオリゴヌクレオチドの濃度を調整した。最終的にスポリゴアレイ生産に用いたオリゴヌクレオチドの配列と溶液の濃度を表 1 に示した。

PCR 産物をプローブとしたスポリゴアレイ

図 4 に被検 DNA 濃度を 5pg/μl として得られた PCR 産物をプローブとして実施したハイブリダイゼーションの結果を示した。最も典型的なパターンは D05 の北京型である。Sp37～45 の位置に陽性スポットが見られ、他の場所にはいっさいのシグナルが見られなかった事から、本法の正確さが検証された。また、C06～12、D01～04 はバングラデシュで分離された結核菌を対象として得られたスポリゴアレイパターンであるが、反応スポットと非反応スポットの差が大きく、

非常に判断しやすい結果となっている。

表1. スポリゴアレイに用いたオリゴヌクレオチドの配列

プローブ番号	プローブ配列 (5'-アミノリンク修飾)	濃度 (μM)	備考
Sp01	TTTTTTTTTATAGAGGTCGCCGGTTCTGGATCA	60	
Sp02	TTTTTTTTTCTCATGCTTGGCGACAGCTTTTG	20	
Sp03	TTTTTTTTTCCGTGCTTCCAGTATCGCCTTCTA	10	
Sp04	TTTTTTTTTACGTCATACGCCGCCAATCATCAG	10	
Sp05	TTTTTTTTTTTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	60	
Sp06	TTTTTTTTTTCGTGCTCATTTCGGCTTCAATTC	40	
Sp07	TTTTTTTTTTGAGGAGAGCGAGTACTCGGGCTGC	5	
Sp08	TTTTTTTTTTCGTGAACCGCCGCCAGCTCGCCG	60	
Sp09	TTTTTTTTTTACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	20	
Sp10	TTTTTTTTTTCGACACCGCTCTAGTTGACTTCC	40	
Sp11	TTTTTTTTTTGTGAGCAACGCCGGCGGCAACTGG	2	
Sp12	TTTTTTTTTTATATCTGCTGCCGCCCGGGAGAT	5	
Sp13	TTTTTTTTTTGACCATCATTTGCCATTCCTCTCC	10	
Sp14	TTTTTTTTTTGGTGTGATGCGGATGGTGGCTCGG	10	
Sp15	TTTTTTTTTCTTGAATAACGCCGAGTGAATTCGCGG	10	
Sp16	TTTTTTTTTTTCGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAATC	20	
Sp17	TTTTTTTTTTGCGCCGGCCCGCGCGATGACTCCG	20	
Sp18	TTTTTTTTTTCATGGACCGCGGCGAGCTGCAGATG	5	
Sp19	TTTTTTTTTTAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	5	
Sp20	TTTTTTTTTTTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	60	
Sp21	TTTTTTTTTTTCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA	10	
Sp22	TTTTTTTTTTACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA	5	
Sp23	TTTTTTTTTTAGCATCGCTGATGCGGTCAGCTCG	5	
Sp24	TTTTTTTTTTCCGCGCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG	5	
Sp25	TTTTTTTTTTGATCAGCGACCCGACCCGTGTCA	2	
Sp26	TTTTTTTTTCTTCAGCACCATCATCGGCGCG	2	
Sp27	TTTTTTTTTTGGATTCGTGATCTGTCCCGCGGAT	10	
Sp28	TTTTTTTTTTTGCCCGCGCGCTTTAGCGATCACAA	5	
Sp29	TTTTTTTTTTAAATACAGGCTCCACGACGACCA	5	
Sp30	TTTTTTTTTTGGTTGCCCGCGCGCTTTTCAGCC	2	
Sp31	TTTTTTTTTTTCAGACAGGTTGCGCTCGATCAAGT	5	
Sp32	TTTTTTTTTTTGACCAATAGGTATCGCGGTGTCA	60	
Sp33	TTTTTTTTTTGACATGACCGCGGTGCCGACTTGACCG	5	
Sp34	TTTTTTTTTTAAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA	2	
Sp35	TTTTTTTTTTCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC	5	
Sp36	TTTTTTTTTTTCGAAATCCAGCACCATCGCGAGC	10	
Sp37	TTTTTTTTTTTCGGAAGTCGTCCACAGTCCCGCTT	5	
Sp38	TTTTTTTTTTTCGTGATGCGGATGCGTTGTGCGC	5	
Sp39	TTTTTTTTTTGACGATGGCCAGTAAATCGCGCTGG	5	
Sp40	TTTTTTTTTTTCGCCATCTGTGCTCATCAGAGTCC	5	
Sp41	TTTTTTTTTTTGAGGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA	20	
Sp42	TTTTTTTTTTTATGGTGGGACATGGACGAGCGGAC	2	
Sp43	TTTTTTTTTTTCGCAGATCGCACCGGTTGCGGGAG	20	
PC	AAAAAAAAAACCGAGAGGGGACGGAAAC	2	陽性対照

TRIAmp 産物をプローブとしたスポリゴアレイ

図 5 に被検 DNA 濃度を 5pg/μl として実施した TRIAmp 産物をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った場合のスポリゴアレイの結果を示した。サンプルは全て図 4 と同一に配置してある。最も典型的なパターンである 822 の北京型においては Sp37～45 の位置に陽性スポットが見られ、他の場所にはいっさいのシグナルが見られなかった事から、本法の正確さが検証されたものと考えられた。しかしながら、その他の 811～821 のサンプルにおいて反応スポットは PCR 産物をプローブとした場合と大きく異なり、また、反応強度にも不均一が目

立ったため、更なる条件検討が必要なものと考えられた。

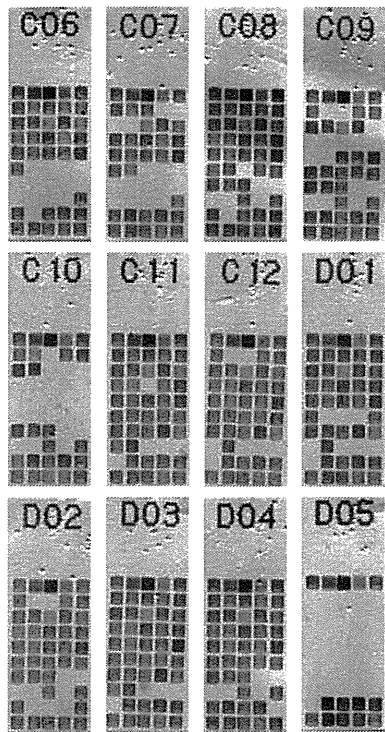


図4. PCR産物をプローブとして得られた典型的な遺伝子型データ

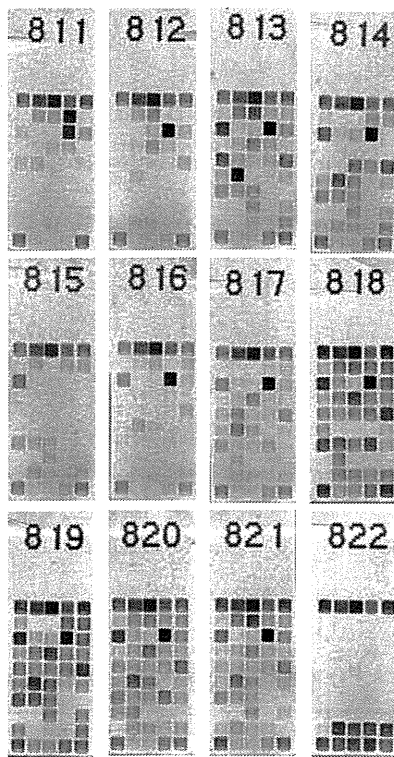


図5. TRIAmp産物をプローブとして得られた典型的な遺伝子型データ

スポリゴアレiy用 TRIAmp 条件の検討

TRIAmp 産物をプローブとして用いたスポリゴアレiyにより得られるスポット強度の

不均一性の原因として、被検 DNA 濃度の低さが考えられた事から、被検 DNA 濃度を 5pg/μl～5ng/μl まで 10 倍ごとに上昇させ、ハイブリダイゼーションを実施した。得られた結果を図 5 に示した。上段は TRIAmp 産物をプローブとした場合に得られた結果、下段は PCR 産物をプローブとした場合に得られた結果である。被検 DNA 濃度を 5ng/μl まで上昇させた場合には PCR 産物をプローブとした場合に得られるものと類似したパターンが得られた。

スポリゴアレiyの技術移転

本研究で開発したスポリゴアレiyのうち、PCR 産物をプローブとしたものについて、フィリピン・STD-AIDS cooperative Central Laboratory、タイ・National Institute of Health、ミャンマー・Department of Medical Research, Lower Myanmar およびネパール・National Tuberculosis Control Program の研究者に技術移転するとともに、現地での実地評価を開始した。また、本法を中国・黒竜江省の多剤耐性結核菌の遺伝子型別に活用した。

	5ng/μL	500pg/μL	50pg/μL	5pg/μL
TRIAmp	823	824	825	826
PCR			827	828

図6. TRIAmp産物をプローブとしたスポリゴアレiy実施条件の最適化

D. 考察

本研究で開発したスポリゴアレiyのうち PCR 産物をプローブとしたものについては完成したものと考えられる。また、TRIAmp 産物をプローブとして用いたものも被検 DNA 濃度を上昇させる事で使用に耐えうる

ものになったと考えられる。

E. 結論

本研究では、全ての *M. tuberculosis* が共通に保有する Direct repeat 領域を標的として迅速、簡便かつ安価な遺伝子型別法を開発した。本研究で開発した等温増幅技術を用いた in tube スポリゴアレイ法は恒温水槽あるいはアルミブロックインキュベーターがあれば実施できる。また、計算上の1検体あたりのコストは約400円と安価であり、アジア・アフリカ等の発展途上国にも導入できる方法であると考えられる。本法の普及によりアジア地域の国々が独自に結核の分子疫学解析を実施する事が可能となる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, H., C. Nakajima, K. Yokoyama, Z. Rahim, Y.U. Kim, H. Oguri, and Y. Suzuki. 2011. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* Quinolone Resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 55: 3661-3667.
- 2) Hang'ombe, M. B., C. Nakajima, A. Ishii, Y. Fukushima, M. Munyeme, W. Matandiko, A. S. Mweene, and Y. Suzuki. 2011. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cattle and Lechwe (*Kobus lechwe kufensis*) at the slaughter house. Vet. Sci. Dev., 1: e5.
- 3) Wang, J., C. L. Zhang, L. Z. Zhang, B. Y. Ji, Y. Liu, Y. Z. Shao, S. L. Jiang, Y. Suzuki, C. Nakajima, C. L. Fan, Y. P. Ma, G. W. Tian, T.

Hattori, and H. Ling. 2011. Genotypes and characteristics of clustering and drug-susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Heilongjiang Province, China. J. Clin. Microbiol., 49: 1354-1362.

2. 学会発表

- 1) Suzuki, Y. How the mycobacteriology laboratory contributes to a better management of multidrug-resistant tuberculosis? 3rd Asia-Pacific Region Conference International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases, July 9-12, 2011, Hong Kong, China
- 2) 金玄、横山和正、中島千絵、鈴木定彦. 結核菌のニューキノロン高度耐性獲得機構 第84回日本ハンセン病学会学術大会、2011年5月 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 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

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)

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（地球規模保健課題推進研究事業）
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.

結核菌の病原性因子 ESAT-6 がマクロファージの機能におよぼす影響を解析した。ESAT-6 が会合する宿主分子を GST 融合タンパク質を用いたプルダウン法により解析した。その結果、従来から ESAT-6 と相互作用することが報告されている Toll-like receptor 2, MHC class I 分子とともに、貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 が GST 融合 ESAT-6 と会合することが明らかになった。細胞内での両分子の会合を解析するため、動物細胞様発現ベクターに LAMP-1, ESAT-6 遺伝子をそれぞれ組み込み、細胞に導入し、免疫沈降法により解析を行った。その結果、ESAT-6 を発現した細胞では、LAMP-1 の発現が著明に減弱することが明らかになった。以上の結果から、ESAT-6 がマクロファージ内で、貪食胞の機能に関わる分子 LAMP-1 と会合し、何らかの分子機構で LAMP-1 を分解し、貪食胞の成熟をブロックしていることが示唆された。

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。結核菌は、自然免疫担当細胞であるマクロファージ内に侵入し増殖することから、結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系による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。今年度は、昨年度に明らかにした、結核菌の ESAT-6 による病原性発揮機構を、会合する宿主分子を同定することにより解析した。

B. 研究方法

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食

胞の成熟を抑制し、増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT-6 が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる *M. bovis* BCG 株で欠損していることが知られている。ESAT-6 は、T 細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、マクロファージの機能に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT-6 が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。GST 融合 ESAT-6 タンパク質を作製し、これをマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の溶解液と混合し、その後 GST pull down を行うことにより、ESAT-6 に会合する宿主分子の同定を試みた。

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、餌水分補給を専門職員に委託し、

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

GST 融合 ESAT-6 タンパク質を用いた GST pull down 解析で、ESAT-6 に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来 ESAT-6 に相互作用することが報告されている、TLR2, MHC class I 分子が同定された。このことから、この解析系は、ESAT-6 の会合分子を解析するのに適した実験系であることが示唆された。そこで、さらにプルダウンされてきたタンパク質のシーケンスを行った結果、これら分子以外に LAMP-1 を同定した。次に、LAMP-1 と ESAT-6 遺伝子をそれぞれ動物細胞様発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞に導入し、免疫沈降法により両分子の会合を解析した。その結果、ESAT-6 を発現した細胞では、LAMP-1 の発現が抑制されることが明らかになった。また、ESAT-6 の種々の deletion mutant を発現させた解析から、ESAT-6 の N 末端から 30-60 塩基の領域が、LAMP-1 の発現抑制に関与することが明らかになった。

D. 考察

結核菌の病原性因子として知られている ESAT-6 に会合する分子として、LAMP-1 を同定した。ESAT-6 を哺乳類細胞に発現させると、LAMP-1 の発現が抑制されることから、結核菌がマクロファージに感染後、貪食胞内で分泌された ESAT-6 が、貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 と会合することにより、LAMP-1 タンパク質を何らかの分子機構で分解し、その結果、貪食胞の成熟を抑制していることが示唆された。今後、ESAT-6 がどのような機構で LAMP-1 の発現を抑制するかを解析していく。

E. 結論

結核菌の病原性因子 ESAT-6 が宿主マクロファージ内での貪食胞の成熟に関与する LAMP-1 を会合することを見出した。ESAT-6

を発現させると LAMP-1 の発現が抑制されることを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saiga, H., Y. Shimada, and K. Takeda. 2011. Innate immune effectors in mycobacterial infection. Clin. Dev. Immunol., 2011: 347594.

2. 学会発表

- 1) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by microbiota and innate immunity. The 46th US-Japan Cholera Conference, Dec 13-15, 2011, Kolkata, India
- 2) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第 40 回日本免疫学会学術集会（国際シンポジウム）2011 年 11 月 27-29 日、千葉
- 3) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第 7 回学術大会、2011 年 10 月 18-19 日、東京
- 4) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington, New Zealand
- 5) 竹田潔, 自然免疫と炎症性疾患. 第 48 回日本眼感染症学会、2011 年 7 月 8-10 日、京都
- 6) 竹田潔, 自然免疫による腸管免疫の制御. 第 28 回日本医学会総会、2011 年 4 月 8-10 日、東京

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)

抗酸菌感染症と神経障害

分担研究報告書

研究分担者

後藤 正道

(国立療養所星塚敬愛園・園長)

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

抗酸菌感染症と神経障害

研究分担者 後藤 正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）

研究協力者 圓 純一郎（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・客員研究員）

研究要旨.

抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* による難治性皮膚疾患であるブルーリ潰瘍の無痛性の原因を解明するため、菌の産生する毒性脂質 Mycolactone の細胞傷害性について検討した。培養シュワン細胞と線維芽細胞に対して Mycolactone A/B を投与して比較したところ、シュワン細胞は線維芽細胞に比べて、同一濃度の Mycolactone A/B で強い細胞壊死とアポトーシスを示した。ブルーリ潰瘍では、シュワン細胞に対する壊死とアポトーシスの両者が病変成立に関与していると考えられる。

A. 研究目的

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*) 感染によってひき起こされる難治性皮膚疾患であり、主に熱帯、亜熱帯地域でみられる。大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成され、重篤な身体後遺症を残すことが多いことからハンセン病と同様に社会的な偏見を受けやすく、治療法の確立が望まれている。WHOは、結核、ハンセン病に次ぐ重要な抗酸菌感染症としてブルーリ潰瘍の対策を行っており、研究分担者はWHOの発症機序研究グループのまとめを担当している。

これまでアジアにおいては、オーストラリア、中国、インドネシア、日本、マレーシア、パプアニューギニア、スリランカなどからブルーリ潰瘍が報告されているが、この数年は、日本国内での症例報告が急増している。本疾患に対する認識が進めば、アジア諸国でも対策が必要な感染症となる可能性が高く、その研究が必要である。

ブルーリ潰瘍では巨大な潰瘍にもかかわらず痛みがない理由は長く不明であった。我々はハンセン病の神経障害についての研究経験を元にブルーリ潰瘍の病変を検索し、末梢神経への菌の侵入を見出した。また *M. ulcerans* は毒性脂質 Mycolactone を産生す

るが、Mycolactone 投与によってマウスにブルーリ潰瘍と同様の末梢神経障害が起きることを見出した。本研究ではこれらの研究を発展させ、ブルーリ潰瘍における無痛性病変成立のメカニズムを解明するとともに、治療を目指した研究基盤の確立を目的とする。

M. ulcerans から精製した Mycolactone は線維芽細胞とマクロファージにアポトーシスを誘導することが報告されている。今年度は人工合成した Mycolactone を用いて、末梢神経の主要な構成細胞であるシュワン細胞に対する細胞傷害性を検討し、線維芽細胞への傷害性との比較検討を行った。

B. 研究方法

1) 培養シュワン細胞と線維芽細胞への Mycolactone 投与

シュワン細胞：SW10 mouse Schwann cells (ATCC CRL-2766) を 10% ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用いて、CO₂ 濃度 5%、33.0℃にて細胞培養を行った。

線維芽細胞：L929 mouse fibroblast cells (ATCC CCL1) を、10% ウマ血清を含む Eagle's Minimum Essential Medium を用いて、CO₂ 濃度 5%、37.0℃にて細胞培養を行っ

た。

合成した Mycolactone A/B (ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与) を 100%エタノール(ETOH)で 1mg/ml に希釈し、さらに培地で段階希釈した。各細胞 8×10^{24} を 6mm ディッシュで 24h 培養し、培地で段階希釈した Mycolactone A/B の 4ml を入れ、それぞれ 3ng/ml、30ng/ml、300ng/ml の最終濃度になるようにした。

対照として 100%ETOH を同様に培地で希釈して最終濃度 300 ng/ml に調整し、培養細胞に加えた。Mycolactone A/B を投与してから、24, 48, 72 時間後にトリパンブルー染色による細胞壊死の観察と定量を行った。

同様に、合成した Mycolactone A/B diastereomer (ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与) を希釈し、各細胞に投与した。24, 48 時間後に、TUNEL 法染色によるアポトーシスの定量を行った。

2) トリパンブルー染色による壊死細胞の定量

トリプシンによって細胞を剥離して試験管に集め、1200 rpm で 5 分間遠沈した後に、10 μ l のトリパンブルー染色液を加えた。細胞計算板を用いて、位相差顕微鏡下に総細胞数とトリパンブルー陽性細胞(壊死細胞)をカウントした。

3) TUNEL 法染色によるアポトーシスの評価・定量

セル・スクレーパーを用いて細胞を剥離し試験管に集め、1200 rpm で 5 分間遠沈した後に、4%パラホルムアルデヒド溶液で 10 分間固定し、シランコートしたスライドグラスの上に広げて乾燥固定した。TUNEL 法染色は、Chemicon, U.S.A. の ApoTag Plus ペリオキシダーゼキット(S7101)を用いて行い、ヘマトキシリンで薄く核染色を行った。顕微鏡写真を撮影し、総細胞数と染色陽性細胞をカウントした。

倫理面への配慮

本研究では、実験株として既に安全性が

確立された細胞株を使用し、感染性を有する実験材料は使用していない。また、廃棄物処理や実験場所に関して、関係法令・指針および研究施設の設けた基準を遵守して行った。

C. 研究結果

1) Mycolactone 投与による細胞形態の変化

線維芽細胞では、実験開始 48 時間後までは全ての濃度においてほとんど変化は見られなかったが、72 時間後に、300ng/ml では一部の細胞が浮遊してきた。

一方、シュワン細胞では、実験開始 24 時間後には Mycolactone A/B 濃度 30ng/ml、300ng/ml では細胞が萎縮して球形になり、培地上に多数浮遊してきており、細胞死が確認された。対照のエタノールと 3ng/ml では浮遊細胞はほとんど確認されなかった。30ng/ml では 48 時間後は一部が残っていたが、72 時間後ではほとんどの細胞が剥離・浮遊していた。300ng/ml の 48 時間後と 72 時間後ではほとんどの細胞が剥離・浮遊していた。

2) トリパンブルー染色による壊死細胞の定量

線維芽細胞においては、形態学的観察ではほとんど変化が見られなかったものの、48 時間後と 72 時間後には一定の割合で染色陽性の細胞が出現し、Mycolactone A/B 濃度 300ng/ml では残存細胞は 32%まで低下していた(図 1、図 2)。

シュワン細胞では、形態学的観察を反映して、30ng/ml と 300ng/ml では 24 時間後から残存細胞は 2/3 程度になり、72 時間後には 0%であった(図 1、図 2)。

3) TUNEL 法染色によるアポトーシスの評価・定量

線維芽細胞では、対照のエタノールと 3ng/ml では 24, 48 時間後共にアポトーシスはほとんど見られなかったが、30ng/ml と 300ng/ml では濃度・時間依存性に陽性細胞が増加し、300ng/ml の 48 時間後では 48%がアポトーシスを示した(図 3、図 4)。