

- 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
- 22) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 千葉
- 23) 塚本裕美子, 田村敏生, 牧野正彦. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from Mycobacterium tuberculosis. 第 40 回日本免疫学会総会 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

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発

分担研究報告書

研究分担者

荒川 宜親

(国立感染症研究所・部長)

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

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学・教授）  
研究協力者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）  
研究協力者 森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）

研究要旨.

多剤耐性結核菌による難治性の結核症や有効な治療薬がほとんど存在しない非結核性抗酸菌症が大きな問題となっている。そのため、新規治療法、特に新規抗結核薬の開発が急務となっている。そこで本研究課題では、新規抗結核薬の開発を目標として、新規抗結核薬の標的となる結核菌由来タンパク質の機能と構造の相関を明らかにするとともに、相関解析結果に基づいて新規抗結核薬のドラッグデザインを進めている。これまでに、新規抗結核薬の標的候補として結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を選び、その詳細な機能と構造の相関関係を明らかにしてきた。その結果、Rv2613c は特異的な基質結合部位を形成していることが明らかとなり、Rv2613c にのみ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。そこで本年度は、Rv2613c の立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーション解析を行うことにより、Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物の候補として、14 種類の化合物を選定した。また、選ばれた候補化合物のうち、Rv2613c の活性のみを阻害して他の類似酵素の活性は阻害しない化合物を最終的なリード化合物として決定するため、比較対照となる類似酵素として *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素を選び、発現と精製、及び活性の確認を行った。さらに、Rv2613c のより詳細な機能構造相関解析の結果から、Rv2613c の活性発現に関与している特異的なループ構造を見いだした。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌や *Mycobacterium avium* に代表される非結核性抗酸菌が引き起こす難治性の感染症が大きな問題となっているにもかかわらず、有効な治療薬がほとんど存在しないことから、新たな治療法、特に新規抗結核薬の開発が臨床現場では強く求められている。現在、いくつかの新規抗結核薬の開発が進められているものの、それらの多くは既存の抗菌薬の構造類縁体であることから、薬剤耐性菌の早期出現や交差耐性等が懸念されている。そのため、新しい作用機序をもつ新規抗結核薬の開発が重要な課題となっている。そこで本研究課題

では、新規抗結核薬の標的となる結核菌由来タンパク質を選び、その詳細な機能と構造の相関を明らかにするとともに、相関解析結果に基づいて新規抗結核薬のドラッグデザインを行うことを目的としている。これまでに、新規抗結核薬の標的候補として結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を選び、その詳細な機能と立体構造を明らかにしてきた (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Protein Expr. Purif.*, 69:99–105., Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Acta Crystallogr.*,

F66:279-281.)。その結果、Rv2613c は他の類似酵素とは異なり、特徴的な 4 量体構造を形成して活性を保持していることが明らかとなった。さらに Rv2613c の機能構造相関解析の結果から、この特徴的な多量体構造を利用して Rv2613c は特異的な基質結合部位を形成していることが示された (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. J. Mol. Biol., 410: 93-104.)。これらの結果より、Rv2613c の基質結合部位に特異的に結合することによって Rv2613c の活性のみを阻害する新規化合物をデザインすることが可能であると考えられた。Rv2613c は、遺伝子破壊株を用いた研究や *in silico* 解析の結果より新規抗結核薬の有力な標的候補の 1 つとして考えられていることから、Rv2613c の活性のみを阻害する新規化合物をデザインすることは新規抗結核薬の開発につながるものとして期待される。また、Rv2613c と類似酵素におけるアミノ酸配列を比較すると、Rv2613c の活性中心部位近傍には他の類似酵素には存在しないアミノ酸残基 (Ala-149 残基) が含まれていることが示された (Fig. 1)。このことから、Ala-149 残基は Rv2613c の活性発現に関与していることが推測された。

そこで本年度は、Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物の候補について、Rv2613c の立体構造情報を用いたドッキングシミュレーション解析による選定を行った。また、選ばれた候補化合物のうち、Rv2613c の活性のみを阻害して他の類似酵素の活性は阻害しない化合物を最終的なリード化合物として決定するため、比較対照となる類似酵素として *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素 (APA1) を選び、発現と精製を行うとともに、その活性を確認した。さらに、Rv2613c の活性中心部位近傍に特異的に存在している Ala-149 残基と活性との関連について明らかにするため、Ala-149 残基を削除した変異体を作成して機能解析を行った。

## B. 研究方法

Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物候補の探索に関する研究では、本研究課題で決定した Rv2613c の立体構造情報 (PDB ID: 3AN0) に基づいて統合計算化学システム (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group) によるドッキングシミュレーション解析を行い、約 30 万種類の化合物の中から候補化合物の選定を行った。

*S. cerevisiae* 由来 APA1 の発現・精製に関する研究では、APA1 を *Escherichia coli* BL21 (DE2) pLysS 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操作により SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。

Ala-149 残基を削除した Rv2613c 変異体に関する研究では、まず市販のキット (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits, Agilent Technologies) を用いて変異体を作成した後、上記の APA1 と同様の手法で発現・精製を行った。

Rv2613c の野生型と変異体、並びに APA1 の活性については、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。実験を行う際には安全講習を受講するとともに、実験計画について各種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

本研究課題におけるこれまでの研究成果より、結核菌由来 Rv2613c は特徴的な多量体構造を利用した特異的な基質結合部位を形成していることが明らかとなった。そこ

で、約 30 万種類の化合物について Rv2613c の立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーション解析を行い、Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物の候補を探索した。その結果、14 種類の化合物が候補として選定された。選択された候補化合物の構造は、複数の環構造やリン酸基、スルホ基を有する構造が多く、既存の抗結核薬の構造とは類似性が認められなかった。14 種類の候補化合物うち市販されている 1 種類の化合物を用いて Rv2613c の活性測定を行ったところ、阻害活性が確認された。その他の 13 種類の化合物については市販されていないため、現在合成中である。

選ばれた候補化合物のうち、Rv2613c の活性のみを阻害して他の類似酵素の活性は阻害しない化合物を最終的なリード化合物として決定するため、比較対照となる類似酵素として、真核生物である *S. cerevisiae* 由来 APA1 を選び、発現と精製、及び活性の測定を行った。その結果、APA1 はリン酸存在下で  $Ap_4A$  を ADP と ATP に分解したことから、APA1 が Rv2613c と同様の  $Ap_4A$  加リン酸分解活性を有することが確認された。

Rv2613c の活性中心部位近傍に特異的に存在している Ala-149 残基 (Fig. 1) と活性との関連について調べるため、Ala-149 残基を削除した変異体を作成してその機能を野生型の機能と比較した。その結果、変異体の活性は野生型の活性と比較して、基質である  $Ap_4A$  に対する  $K_m$  値が上昇し  $K_{cat}$  値が低下していたことから、Ala-149 残基は Rv2613c の活性発現に深く関与していることが示唆された。また、野生型は  $Ap_4A$  以外の多くの dinucleoside polyphosphate も良好な基質として利用可能であるのに対して、変異体では  $Ap_4A$  と diadenosine hexaphosphate に対する基質特異性が高まっており、基質認識能が大きく異なっていた。一方、Rv2813c の立体構造情報から、Ala-149 残基は基質の結合には直接関わっていないものの、基質結合部位と活性中心部位を構成しているループ上に存在していることが示された (Fig. 2)。

#### D. 考察

Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物の候補として選定された 14 種類の化合物の構造は、既存の抗結核薬の構造とは大きく異なっていた。従って、これらの化合物の構造を基にして Rv2613c の活性のみを阻害する新規化合物をデザインすることは、新しい作用機序を持つ新規抗結核薬の開発につながるものとして期待される。

Rv2613c の類似酵素として発現・精製した APA1 は Rv2613c と同様の  $Ap_4A$  加リン酸分解活性を示したことから、今後 Rv2613c の活性のみを阻害する化合物を選定する際の比較対照として APA1 が利用可能であることが示された。

Rv2613c の活性中心部位近傍にのみ存在している Ala-149 残基は、Rv2613c の活性発現、特に基質認識能に深く関与していることが示された。Ala-149 残基は基質結合部位や活性中心部位を構成しているループ上に存在していることから、Rv2613c は Ala-149 残基が存在している分だけ他の類似酵素と比較して、このループ構造の可変領域が広がっていることが推測された (Fig. 2)。Rv2613c は他の類似酵素と比較して幅広い基質を利用可能であることから、この可変領域の広い特異的なループ構造が Rv2613c の基質認識能に関与していることが示唆された。このような Rv2613c の活性発現に関与している特異的なループ構造は、Rv2613c の活性のみを阻害する新規化合物をデザインする際に有用な構造情報であると考えられた。

#### E. 結論

結核菌由来 Rv2613c を標的とする新規抗結核薬のドラッグデザインに必要なリード化合物の候補を選定した。

リード化合物を決定する際に利用する類似酵素として *S. cerevisiae* 由来 APA1 の精製と活性の確認を行った。

活性発現に関与している Rv2613c に特異的なループ構造を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. Structural insights into the novel diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. J. Mol. Biol., 410: 93-104.

2. 学会発表

1. Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. Structural Insights into the Novel Diadenosine Tetrphosphate Phosphorylase from

Mycobacterium tuberculosis H37Rv. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 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<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate 加リン酸分解酵素の活性発現に関わる構造的要因の解明. 第 63 回日本生物工学大会 2011 年 9 月 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

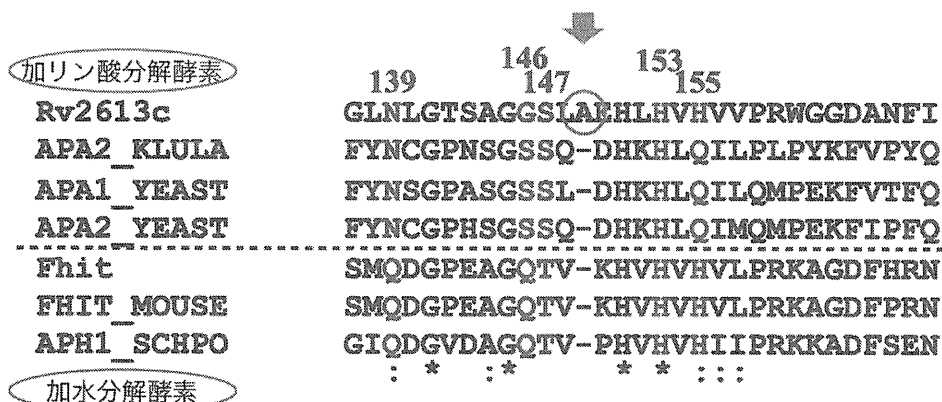


Fig. 1 活性中心部位近傍における Rv2613c と類似酵素のアミノ酸配列のアライメント。上の数字は Rv2613c におけるアミノ酸残基の番号。矢印で示した Ala-149 残基が結核菌由来 Rv2613c に特異的に存在しているアミノ酸残基。

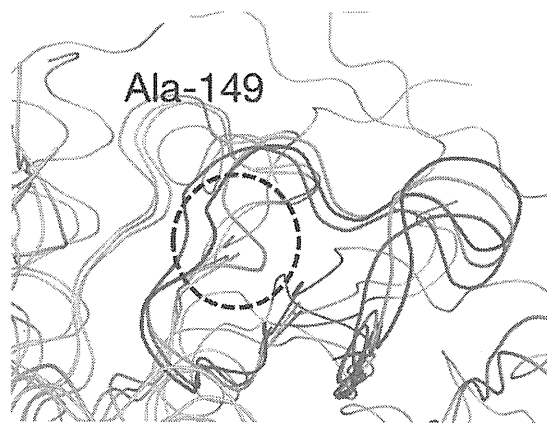


Fig. 2 Rv2613c のループ構造と類似酵素のループ構造を重ね合わせた結果。Ala-149 残基の位置を囲んで示している。Ala-149 残基が存在しているため、Rv2613c のループ構造のみが可変領域が大きい構造となっている。

平成23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

結核菌分泌蛋白由来の Th1 誘導型ペプチド：Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導機構及びこのペプチドによって分化・活性化する Th1 細胞の CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞 (CTL) 分化誘導における 'Help' の分子機序を明らかにすることで新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを目的としている。

昨年度までに①Peptide-25 は Th1 分化の主要制御因子である T-bet 非依存性な Th1 分化を誘導すること、②T-bet 非依存性の Th1 分化において 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調節する因子であること、③Peptide-25 が誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみが機能的 CTL 分化を誘導できること、④この Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化は CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F によって調節されている可能性があることを明らかにしてきた。

本年度は Peptide-25 による IL-12 受容体 (R) β2 鎖の発現誘導における STAT4 の役割及び Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化における IL-17F の役割を明らかにすることを目的に解析を行った。その結果、①CD4 と会合している Lck が IL-12R β2 鎖の発現を誘導する STAT4 のチロシンリン酸化を誘導している可能性があること、②IL-17F が樹状細胞の活性化誘導能を有していること、③IL-17F の産生誘導には T 細胞抗原受容体からの活性化シグナルに加え、副刺激分子間相互作用が必要であること、④IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なる細胞集団であることが明らかとなり、Th1 誘導型ペプチドが CTL の活性化調節作用を有する IFN-γ を産生する Th1 細胞と樹状細胞の活性化誘導作用を有する IL-17F を産生するヘルパー T 細胞亜集団への分化を誘導することで機能的 CTL の分化・活性化を強力に誘導する活性を有していることが示唆された。

A. 研究目的

ワクチンの目的は病原体特異的獲得免疫反応を惹起させ、メモリー型実効細胞を生成させることである。結核防御において自然免疫系のマクロファージ、獲得免疫系の CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞 (CTL) が実効細胞であると考えられている。したがって、結核ワクチンにおいては長期生存型メモリー CTL の分化を効果的に誘導することがその成否

の鍵である。しかしながら、現在結核ワクチンとして用いられている BCG ワクチンは効果の持続期間が短く、成人に対する有効性が低いことが指摘されている。このことは BCG ワクチンが長期生存型メモリー CTL の分化を効果的に誘導できていないことを示している。

長期生存型メモリー CTL 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 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を産生する CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の存在が不可欠であり、CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の 'Help' が存在しない場合にはメモリーCTL の分化が誘導されないことが報告されている。分化したメモリーCTL 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> Th1 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。したがって、より効果的な結核ワクチンを開発するためには CD4<sup>+</sup> Th1 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることが重要である。

結核菌の分泌蛋白である Ag85B はヒト、マウスに対して強い免疫原性を有し、この蛋白のみで強力に Th1 分化を誘導することが知られている。我々は Ag85B のマウスにおけるヘルパーエピトープとして Peptide-25: アミノ酸配列: FQDAYNAAGGH NAVF) を同定し、このペプチドが Th1 分化を選択的に誘導することを見出した。そこで本研究では、結核菌分泌蛋白由来の Th1 誘導型ペプチド: Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導機構及びこのペプチドによって分化・活性化する Th1 細胞の CTL 分化誘導における 'Help' の分子機序を明らかにすることで新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを目的としている。

これまでに 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、Peptide-25 による Th1 分化誘導機構を解析した結果、①Peptide-25 は Th1 分化の主要制御因子である T-bet 非依存的な Th1 分化を誘導すること、②T-bet 非依存性の Th1 分化において 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調節する因子であることを明らかにしてきた。また、卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1) を用いた *in vitro* CTL 分化誘導実験系による解析から③Peptide-25 が誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した樹状細胞のみが CD8<sup>+</sup> T 細胞を機能的 CTL へと

分化させることができること、②この Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化は CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F によって調節されている可能性を示してきた。

本年度は Peptide-25 による IL-12 受容体 (R)  $\beta$  2 鎖の発現誘導における STAT4 の役割及び Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化における IL-17F の役割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 IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現誘導における STAT4 の役割の検討

T-bet 欠損 P25 TCR-Tg (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システム (BD Bioscience) を用い、CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。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、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 で刺激し、経時的に CD4<sup>+</sup> T 細胞を回収した。PE 標識抗 IL-12R  $\beta$  2 抗体を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞上の IL-12R  $\beta$  2 鎖を、PE 標識抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞内の活性化 STAT4 を染色し、それぞれの発現量を評価した。

STAT4 の活性化及び IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現誘導における TCR の関与を検討するために T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞をチロシンリン酸化酵素阻害剤である HerbimycinA と 20 時間共培養した後、I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激した。刺激後の IL-12R  $\beta$  2 鎖及び活性化 STAT4 の発現量を評価した。

### (2) *in vitro* での CTL の分化誘導及び活性の評価

P25 TCR-Tg (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システム (BD Bioscience) を用い、CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。OT-1 (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システムを用い CD8<sup>+</sup> T 細胞を調製した。C57BL/6 マウス脾臓細胞より IMag システムを用いて樹状細胞を調製し抗原提示細胞として用いた。

機能的 CTL の分化を誘導できる樹状細胞

の活性化における IL-17F の役割を検討するために、樹状細胞を Peptide-25 または TCR に対して低親和性であり、Th2 免疫応答を誘導する活性を有している Peptide-25 変異体 APL:G248A(FQDAYNAAAGHNAVF) 及び OVA 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と共培養する際に IL-17F に対する中和抗体もしくはリコンビナント(r) IL-17F を添加した。培養 1 日後、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞及び余剰の抗原、抗体及び rIL-17F を取り除いた OVA を取り込んだ樹状細胞を OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B 産生を指標に機能的 CTL への分化を評価した。

### (3) Peptide-25 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序の検討

樹状細胞または I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 または APL で刺激した。培養 1 日後に CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。

### 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 IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現誘導における STAT4 の役割の検討

Peptide-25 刺激によって T-bet 非依存的に *ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリング及び IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現が誘導されること、このうち *ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングは TAF7 が調節していること、IL-12R $\beta$ 2 の発現は STAT4 が調節していることを示してきた。そこで、Peptide-25 刺激で誘導される STAT4 のチロシンリン酸化を担う分子の同定を試みた。Peptide-25 刺激 24 時間後に STAT4 の著明なチロシンリン酸化が誘導されたことから、Peptide-25 刺激によって誘導されるサイトカインが STAT4 のチロシンリン酸化を誘導している可能性が考えられる。そこで、Peptide-25 刺激で産生が認められる IL-2、IFN- $\gamma$  に対する抗体を刺激をする際に加えたが、対照抗体(Rat

IgG)を加えた場合と同程度の STAT4 のチロシンリン酸化が誘導された。また、文献的に STAT4 のリン酸化を誘導することが知られている IL-23、IL-27、IFN- $\alpha$  に関して Real-Time PCR 法にて発現を解析したが、刺激後 48 時間以内にそれらサイトカインの発現は認められなかった。

CD4 に会合している Lck 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、Lck の活性阻害剤である HerbimycinA を添加し、部分的に Lck の活性を阻害する条件で STAT4 のチロシンリン酸化、IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を検討した。その結果、HerbimycinA 処理によって STAT4 のリン酸化が部分的に抑制され、結果として IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現が完全に抑制されることが明らかとなった。

### (2) 機能的 CTL 分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用における IL-17F の役割の検討

機能的 CTL 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、IL-17F が Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生されることをこれまでに明らかにしてきた。

そこで、CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用における IL-17F の役割を明らかにするために P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 及び OVA 存在下に樹状細胞を培養する際に IL-17F の中和抗体を添加し、CTL への分化誘導における影響を検討した。その結果、IL-17F の中和抗体用量依存的に CD8<sup>+</sup> T 細胞から CTL への分化の頻度が低下した。

さらに樹状細胞を suboptimal 用量の Peptide-25 または optimal 用量の APL と共に培養する際に rIL-17F を添加し、CTL 分化に対する影響を検討した。その結果、suboptimal 用量の Peptide-25 と共培養する際に rIL-17F を添加すると CTL 細胞への

分化の頻度が高まった。一方、optimal 用量の APL との培養の場合には、rIL-17F を加えても CTL への分化は誘導されなかった。そこで、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または APL 及び OVA 存在下に樹状細胞を 24 時間培養した後の樹状細胞上の IL-17R の発現を FACS にて検討した。その結果、Peptide-25、APL いずれの場合も IL-17R は同程度発現していた。

#### (2) Peptide-25 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序の検討

樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 で刺激し、24 時間後の IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。その結果、Peptide-25 刺激では IL-17F と IFN- $\gamma$  はそれぞれ異なる細胞群から産生され、両方のサイトカインを産生する細胞は検出されなかった。また、IL-17A の産生は全く見られなかった。

P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生は TCR からの活性化シグナルのみで十分に誘導される。そこで、I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞を用い、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞から IL-17F 産生におけるサイトカイン及び副刺激分子間相互作用の関与を検討した。その結果、I-A<sup>b</sup>-CHO 細胞を用いた場合には IFN- $\gamma$  産生は誘導されるものの、IL-17F 産生は全く誘導されなかった。また、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生には T-bet 非依存的な誘導機構が存在する。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて IL-17F 産生における T-bet の役割を検討した。その結果 T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞においても野生型と同程度の IL-17F を産生した。

#### D. 考察

一般的に STAT4 のチロシンリン酸化は IL-12、IL-23、IL-27、IFN- $\alpha$  などの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。しかしながら我々の実験系ではそれらサイトカインの産生は mRNA 及び蛋白レベルいずれにおいても検出されなかった。さらに CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生が確認されている IL-2 及び IFN- $\gamma$  に対する中和抗体を用いても STAT4 のチロ

シンリン酸化は全く影響を受けなかったことから Peptide-25 が誘導する STAT4 のチロシンリン酸化は Jak 非依存的に誘導されている可能性が高い。

CD4 に会合している Lck 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、Lck の活性阻害剤である HerbimycinA を用い、STAT4 のチロシンリン酸化、IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現を検討した結果、Lck の活性と STAT4 のチロシンリン酸化、IL-12R  $\beta$  2 鎖の発現量が相関していた。今後 Lck の活性化の経時的変化を検討し、Lck が直接 STAT4 のリン酸化を誘導できるか確定する予定である。

IL-17F は IL-17A とともに Th17 細胞から分泌されるサイトカインである。IL-17F と IL-17A は 50%程度のアミノ酸配列の相同性を有しているが、IL-17A が炎症性サイトカインの一種で自己免疫やアレルギー反応において中心的な役割を果たしているのに対し、IL-17F は細胞外増殖性細菌感染防御において重要な役割を果たしており、生体内で異なる免疫反応の制御を担っている可能性が高い。

本研究において、IL-17F に対する中和抗体を添加することによって Peptide-25 刺激による CTL 分化の頻度が低下したこと、一方 rIL-17F の添加によって Peptide-25 刺激で誘導される CTL 分化の頻度が高まったことから、IL-17F が機能的 CTL 分化を誘導する樹状細胞の活性化を誘導するという新たな活性を有していることが示された。

I-A<sup>b</sup>-CHO を用いた解析から CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導には Th1 分化を誘導する TCR からの活性化シグナルに加え、副刺激分子間相互作用が必要であることが示された。また T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞においても IL-17F 産生が誘導されたことから IL-17F 産生には T-bet は関与していないことも示された。さらに IL-17F 産生細胞が IL-17A を産生しなかったことから Peptide-25 が誘導する IL-17F 産生細胞が Th17 細胞とは異なる亜集団である可能性が示された。今後、CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序に関して検討を行う予定であ

る。

APL 刺激の際に rIL-17F を添加しても CTL への分化が誘導できなかったことから① APL 刺激では樹状細胞に IL-17R の発現を誘導できない可能性、②IL-17F の作用には他の共役因子が必要である可能性が示された。そこで、Peptide-25 及び APL 刺激後の樹状細胞の IL-17R の発現を検討した結果、APL 刺激または Peptide-25 刺激、いずれの刺激でも同程度に IL-17R が発現していたことから、IL-17F の作用には他の共役因子が必要である可能性が示された。今後樹状細胞に対する IL-17F の作用機序に関して検討を行う予定である。

## E. 結論

結核菌分泌蛋白由来 Th1 誘導型ペプチド：Peptide-25 は CTL の活性化調節作用を有する IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞と樹状細胞の活性化誘導作用を有する可能性がある IL-17F を産生するヘルパー T 細胞亜集団への分化を誘導することで機能的細胞傷害性 T 細胞の分化・活性化を強力に誘導できることが示唆された。

アジアにおいて感染症で死亡する患者の死因の第 1 位は結核である。この研究によって明らかとなる長期生存型メモリー CTL の誘導機序から BCG に代わる新たな結核ワクチンの開発戦略が得られるものと考ええる。この結核ワクチンは有効性が増強し、さらに有効期間が延長されることが期待され、結核の予防に大いに貢献できるものと考えられる。

## 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 facilitates induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Negl. Trop. Dis., 5:e1401.
- 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.

### 2. 学会発表

- 1) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet- independent manner. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011. Sapporo, Japan.
- 2) 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. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011. Sapporo, Japan.
- 3) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naive T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011. Sapporo, Japan.
- 4) 田村敏生, 牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 2011 年 11 月 千葉.
- 5) Tsukamoto, Y., T. Tamura, and M. Makino. Immunostimulatory Activity of Major Membrane Protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. 第 40 回日本免疫学会総会・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

(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.

本邦の結核罹患率は1950年代と比較すると減少しているが、依然として集団感染例いわゆる感染アウトブレイクは毎年生じている。我々は結核菌由来 micro RNA (miRNA) の発現パターンが結核菌臨床アウトブレイク予測のバイオマーカーとなりうることを仮定して研究を開始した。結核菌から抽出した菌由来 miRNA を6種類見出しそれらに対する定量的PCR法を開発した。次いで結核菌に acid stress, oxidative stress, hypoxic stress を加え、6種類の RNA の発現の変化を解析した。低 pH 条件と高酸化条件によって誘導される RNA 量は同様の結果となったが、これらは低酸素条件によって誘導される RNA パターンとは異なった結果であった。次年度以降は実際にアウトブレイクを生じた臨床分離株を使用して RNA 量を定量し、これらがアウトブレイクを迅速に予測・発見する指標として使用できないかを解析する予定である。

A. 研究目的

現在の本邦における結核対策の一つの要諦として「感染アウトブレイク対策」があげられる。かつて国民病として恐れられた結核であるが、現在の本邦は中蔓延国であり、結核罹患率は人口10万人あたり18人である(2010年)。この数字は10人以下の欧米と比較して多いとも言えるが、1950年ごろの結核罹患率500人と比較して大幅に減少していることは事実である。しかし毎年のように集団感染例いわゆる感染アウトブレイクが散見される。この理由として受診の遅れ、診断の遅れ、発見の遅れが示唆されている。このような「遅れ」が生じる理由として「結核に対する関心が医療者を含めて国民間で低下していること」が挙げられている。

一方感染アウトブレイクが頻発する現実を科学的に解釈するとすれば「感染アウトブレイクを生じさせるような臨床分離株の鑑別が可能になっていない」現実が挙げられよう。予めアウトブレイクを生じさせる臨床分離株を迅速に同定することができるならば、臨床現場において速やかに対応し

罹患する患者数を減少させることができよう。感染アウトブレイクを生じさせる臨床株を迅速に予測・発見することは厚生行政の観点あるいは医療経済の観点から重要なことと考えられる。

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。miRNA はさまざまな癌・リンパ腫で発現が確認されている。例えば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。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。その他にRNA-RNA、RNA-DNAといった核酸相補性による機能だけでなく、RNA-タンパク質、細胞内構造体形成の足場とした働きを持つ。ウイルス感染でも発現が確認されているが、現在のところ抗酸菌感染症における菌のmiRNAの役割は不明である。

グラム陰性菌とグラム陽性菌の研究から、小型の翻訳されないRNAが存在し、長い(通

常の) mRNA 制御に関与していることが知られている。また哺乳類の miRNA の解析から、miRNA は宿主の様々な生命現象を制御していることが知られているので一つの miRNA が様々な mRNA を制御していることが想定される。結核菌は ORF が 3900 もあるが、それらを coordinate する因子が存在するかもしれない。もし結核菌に miRNA が存在するのであれば、少数の miRNA が結核菌の様々な生命現象制御を司っているかもしれない。結核菌由来 miRNA の挙動で、結核菌の病原性や感染性あるいは再活性化を予想することができるかもしれない。以上の理由から結核菌由来 miRNA は結核菌感染症臨床アウトブレイクのバイオマーカーの候補になる可能性がある。

本研究では結核菌由来 miRNA を通常の好気性培養液から抽出し real time PCR 法を使用する定量法を開発すること、そして低 pH 条件、高酸化条件、低酸素条件における菌由来 miRNA 量を定量することを目的とした。

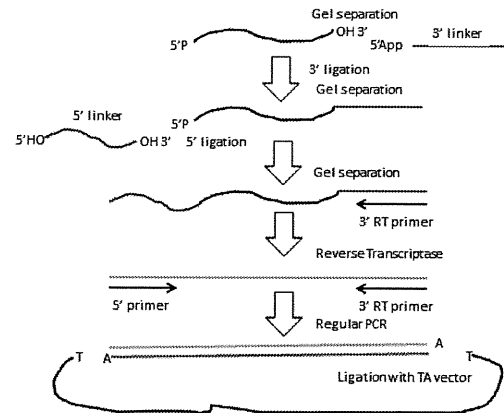
## B. 研究方法

好気性下で Exponential phase の結核菌 H37Rv から 250 ug の total RNA を抽出した。Denaturing polyacrylamide で電気泳動を行った。miRNA の存在する 20-40mer 近辺を切除し、RNA 抽出した。3' linker (=20 mer) を ligation した。再び電気泳動し、ゲル切除。5' linker (=20 mer) を ligation した。再び電気泳動し、ゲル切除。3' RT primer を使用して逆転写。5' primer と 3' RT primer で PCR した、PCR 産物を TA cloning vector に ligation 後 cloning し、Sequence を行った(図 1)。

得られた RNA シークエンスを Sanger Institute web 上で抗酸菌 sequence の homology search を行った。使用した website は以下の通りである。

<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/mycobacterium>

Genetyx-Mac を利用して得られたシークエンスを同じ配列を持つもの同士に並び替えた。



(図 1) 結核菌から直接 20-40 mer の小型 RNA をクローニングした。クローニングした DNA をシークエンスして塩基配列を調べた。

今年度は miRNA から特に出現頻度の高かったものを 6 種類選び解析をおこなった。

次に様々なストレスを結核菌 H37Rv に与えた。Acid stress として pH 5 の 7H9 の培養液で 2 日間培養した。Oxidative stress としては H2O2 を最終濃度 10 mM 添加、1 時間培養した。Hypoxic stress としては O2 濃度 1.0%, CO2 濃度 5.0% で 1 週間培養後再度 miRNA を抽出し開発した RT-real time PCR の系で発現量を解析した。

## C. 研究結果

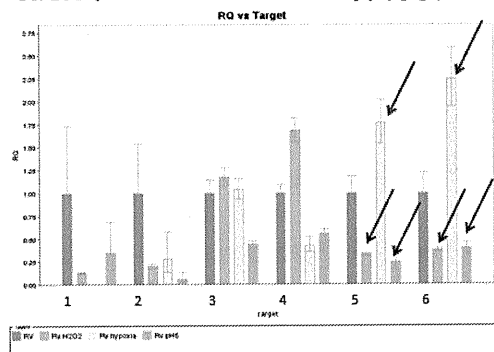
合計 69 個の長さ 20-50mer の小型 RNA を発見した。抗酸菌 sequence の Blast search を行ったところ塩基配列は結核菌のゲノムと相補的に一致した。よって全部が結核菌由来の小型 RNA であると結論付けることができた。Parallel editor を使用してこれらの RNA を比較したところ多くの RNA は頻回に出現しこれらの RNA が単なる degradation product ではない可能性が示唆された。

このうち特に出現頻度が高かった結核菌由来小型 RNA を 6 種類選び、real time RT-PCR の系を作成し結核菌由来 16S rRNA を対照としてその発現量を比較した。

様々なストレスを結核菌に与えて RNA の発現量を比較した実験では、acid stress

と Oxidative stress によって誘導される RNA 量は同様の結果となり、Hypoxic stress によって誘導される RNA 量とは異なった結果であった。

Hypoxic stress で誘導される miRNA は Acid stress や Oxidative stress では抑制された



(図 2) 結核菌由来の miRNA を hypoxic stress、acid stress、oxidative stress 下で培養しその発現を相対的に比較した

また図 2 にもあるように Hypoxic stress で誘導される RNA は acid stress と Oxidative stress では抑制される結果となった。

#### D. 考察

今年度の研究では結核菌由来の小型の翻訳されない 6 種類の RNA を好気性培養された結核菌から発見した。これらの RNA の挙動を解析するために様々な条件下で結核菌を培養しその発現量を比較した。

結核菌由来 miRNA は低酸素下、低 pH 下、あるいは酸化ストレス下で発現が異なり、外的環境によってその発現が違っていることが明らかとなった。

次年度以降の予定としては以下の実験を予定している。

1. 結核菌において哺乳類に見られる miRNA 関連遺伝子の存在を確認する。
  - 1-1. Dicer や Ago protein の homolog が結核菌に存在するか？
  - 1-2. 全く新規のシステムで miRNA が生成されるのか？
2. 宿主細胞で今年度行ったものと同様の assay を行う
  - 2-1. 宿主由来の miRNA 関連遺伝子を借用している可能性

2-2. 慢性持続感染に菌由来 miRNA が関与している可能性

3. 結核菌と miRNA の相互関係を解析する

3-1. 結核菌に菌由来 miRNA を強制発現させ、表現型がどう変化するか assay を行う

3-2. 結核菌に菌由来 miRNA の anti-sense oligo を導入し、表現型がどう変化するか assay を行う

4. 臨床分離株を使用した assay を行う

結核研究所はアウトブレイクを起こした臨床分離株を保存してあるので、その株を利用して miRNA real time RT-PCR assay を行う

#### E. 結論

結核菌由来の miRNA を好気性条件下に培養した結核菌から抽出し、その 6 種類の定量的 PCR 法を開発した。低酸素条件を含む様々な条件下で結核菌を培養しこれらの miRNA の発現を比較した。次年度以降これらの miRNA が感染アウトブレイクを生じさせる結核菌においてその発現が他の結核菌と異なるかどうかを検討する予定である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ariga, H., H. Nagai, A. Kurashima, Y. Hoshino, S. Shoji, and Y. Nakajima. 2011. Stratified Threshold Values of QuantiFERON Assay for Diagnosing Tuberculosis Infection in Immunocompromised Populations. Tuberculosis Research and Treatment, in press.
- 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2011. Mycobacterium shigaense sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. J. Dermatol., in press.



- 3) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. V. Med.*, in press.
- 4) Otsuki, T., S. Izaki, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, and K. Osamura. 2011. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection: a sporadic case in Japan. *J. Dermatol.*, in press.
- 5) Onoe, H., K. Nakanaga, R. R. Yotsu, Y. Hoshino, N. Ishii, T. Takeuchi. 2011. Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient. *J. Dermatol.*, in press.
- 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed during 1980–2010 in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 3829–3836.
2. 学会発表
- 1) 星野仁彦. 日本人の Genetic background と IGRA 第 86 回日本結核病学会総会 ミニシンポジウム 3 IGRA の新しい展開 平成 23 年 5 月 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  
(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.

自然免疫応答に関わることが予想される分子群 (GBP family, ヒアルロン酸合成酵素、AIM2) に標的を絞り、これら分子群の結核感染防御における役割をノックアウトマウスを作製し、解析した。クロモソーム 3 に位置する GBP ファミリー遺伝子のノックアウトマウス由来のマクロファージは、結核菌に対する感受性に変化が認められなかった。ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 の欠損マウスは、結核菌の気道感染により、生存率が変化しなかった。細胞内の DNA センサーである AIM2 の欠損マウスは、結核菌感染後全例が 7 週以内に死亡し、肺での結核菌数も有意に増加した。結核感染後の血清中の IL-18 濃度の上昇も AIM2 欠損マウスでは、認められなかった。

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する。特に、自然免疫応答に関わることが予想される分子群 (GBP family, ヒアルロン酸合成酵素、AIM2) に標的を絞り、これら分子群の結核感染防御における役割を明らかにする。これらの解析から、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

本研究では、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。クロモソーム 3 に存在する GBP ファミリー、クロモソーム 5 に存在する GBP ファミリー、それぞれ E S 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 E S 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 E S 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。また、このマウスから、マクロファージを単離し、試験管レベルで結核菌を感染させ、感染後の細胞内結核菌数を測定する。

GBP family 以外にも、結核菌が感染宿主内で細胞外増殖を行うために必要とするヒアルロン酸の合成酵素、Hyaluronan synthase 1, 3 (HAS1, HAS3) が肺では発現が高いことが知られている。そこで HAS1, HAS3 の遺伝子欠損マウスを定法により作製し、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。

また、細胞内 DNA センサーとして同定された Absent in Melanoma 2 (AIM2) の結核感染における役割も、遺伝子欠損マウスを定法により作製し、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

GBP クロモゾーム 3 の欠損マウスからマ

クロファージを単離し、試験管レベルで結核菌を感染させ、感染 1, 3, 5, 7 日後の細胞内結核菌数を測定した。その結果、GBP クロモゾーム 3 の欠損マウス由来のマクロファージと正常マウス由来のマクロファージの間で結核菌数に有意な変化は見られなかった。

次に、HAS1 欠損マウスに結核菌を経気道的に感染させ、その後の生存率を野生型マウスと比較した。その結果、HAS1 欠損マウスと野生型マウスの間に感受性の有意な差は見られなかった。

次に AIM2 欠損マウスに結核菌を経気道的に感染させ、その後の生存率を野生型マウスと比較した。その結果、AIM2 欠損マウスは、全例が 7 週以内に死亡した。また、感染 4 週後の肺や肝臓の結核菌数も AIM2 欠損マウスで有意に増加していた。このように、AIM2 欠損マウスは、野生型マウスに比べて有意に結核感染に対する感受性が高いことが明らかになった。AIM2 はインフラマゾームを活性化させ、IL-1beta/IL-18 などの IL-1 ファミリーサイトカインの分泌を誘導することが知られている。そこで、結核菌感染後の血清中の IL-18 の濃度を測定した。野生型マウスでは結核感染 3 週後に血清中 IL-18 濃度が上昇したが、AIM2 欠損マウスでは全く上昇しなかった。IL-18 は Th1 応答に関与していることが知られているので、次に結核感染 3 週後の脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの IFN-gamma 産生を解析した。その結果、AIM2 欠損マウスでは、IFN-gamma 産生が野生型マウスに比べて有意に低下していた。

#### D. 考察

GBP クロモゾーム 3 の欠損マウスは、細胞内寄生性原虫 *Toxoplasma gondii* 感染に対する感受性が極めて高いことを見出している。結核感染に対する感受性も高くなることが期待されたが、変化が認められなかった。最近 Science 誌(332, 717-721, 2011) に、GBP1 欠損マウスにおいて BCG 感染後の肺の菌数が高くなることも報告されていたが、我々の結果はこれとも合致しなかった。