

今後、さらに慎重に結核感染における GBP ファミリーの役割を解析していきたい。

HAS1 欠損マウスでは、結核感染後の生存率には差が認められなかった。今後、感染後の肺における結核菌数などを測定し、HAS1 欠損によるヒアルロン酸量低下により結核菌増殖が阻害される可能性についても解析したい。また HAS3 欠損マウスも遅れて作製したので、HAS1/3 二重欠損マウスの作製も行い、結核感染に対する感受性を解析していく。

AIM2 欠損マウスは、結核感染に対する感受性が極めて高くなった。AIM2 は細胞内で DNA を認識し、インフラマゾームを活性化し、IL-1 ファミリーサイトカインの分泌を誘導する分子として知られている。実際、AIM2 欠損マウスでは、結核感染後の IL-18 濃度の上昇が認められなかった。今後、AIM2 がどのように結核菌を認識しているかを明らかにしていきたい。

E. 結論

GBP ファミリーは、結核感染にそれほど重要な役割を有していないことが示された。HAS1 欠損マウスは、結核感染に高感受性に成らなかった。AIM2 欠損マウスは結核感染に高感受性であった。また血清中の IL-18 濃度の上昇も認められなかった。

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

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核慢性感染の成立・維持における肺環境内恒常性に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

河村 伊久雄

(京都大学・准教授)

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

結核慢性感染の成立・維持における肺環境内恒常性に関する研究

研究分担者 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）
研究協力者 酒井 俊祐（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・研究員）

研究要旨.

活性化 T 細胞上に発現する抑制性補助因子 PD-1 は、抗原提示細胞上に発現する特異的リガンドである PD-L1/2 と会合して、T 細胞の活性化を抑制するシグナルを細胞内に伝達する。ウイルスや細菌感染後に PD-1 経路が活性化されると、特異的 T 細胞の機能が阻害され、感染の慢性化に繋がるということが報告されている。そこで、慢性感染を引き起こす結核に対する感染防御における PD-1 経路の関与について調べた。正常マウスと PD-1 欠損マウスに結核菌を感染させたところ、正常マウスに比べて PD-1 欠損マウスは結核菌感染に対して感受性を示し、著しい菌数の増加が肺において認められた。また、感染後の PD-1 欠損マウスの肺では TNF- α 、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインや各種ケモカイン産生の亢進と、マクロファージや好中球を中心とした炎症細胞の著明な浸潤、および壊死を伴う広範な炎症性病変が観察された。これらの結果から、PD-1 を介した抑制性シグナルが機能しないと、結核菌感染後の肺では過剰な炎症反応が惹起され、感染した菌の増殖を制御できなくなることが明らかとなった。この原因について解析した結果、正常マウスと PD-1 欠損マウスのマクロファージ機能や結核菌感染後の肺に浸潤してくる CD8⁺ T 細胞の反応性には明らかな違いは認められなかった。しかし、PD-1 欠損マウスの肺では、結核菌感染後に IFN- γ 産生能を有する抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の著明な増加が認められた。そこで、RAG2 欠損マウスに正常および PD-1 欠損マウス由来の CD4⁺ T 細胞を移入した後、結核菌を感染させて、その後の生存率を比較した。その結果、PD-1 欠損マウスの CD4⁺ T 細胞を移入したマウスは感染後早期に死亡することが示された。また、結核菌感染後に抗 IFN- γ 抗体を投与することにより、PD-1 欠損マウスの肺で見られた菌数の著明な増加が抑制され、致死率や炎症反応の改善が認められた。以上の結果から、PD-1 経路は結核菌感染初期に誘導される CD4⁺ T 細胞の機能を適度に制御し、過剰な炎症反応を引き起こさないようにするために重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

結核は現在でも人類の脅威となる重要な感染症である。結核の原因菌である結核菌が感染しても多くの場合結核の発症はせず、そのまま長期間に渡り体内で生存し続ける。その後、宿主の抵抗性が低下すると菌は再び増殖をはじめ、結核を発症する。一方、結核菌が感染した宿主では、抗原特異的 Th1 型 CD4⁺ T 細胞の出現と共に結核菌に対する

防御免疫が発現する。このため、感染 3-4 週間後になると菌の増殖を阻害できるようになるが、菌を体内から排除することはできない。これらの事実は、結核菌が感染宿主の防御機構に抵抗する優れた機序を獲得していることを示すものである。

T 細胞の増殖や機能分化には、抗原提示細胞からの抗原提示と costimulatory 分子を介した刺激が必要となる。CD28/B7 ファミリ

一に属する分子(例えば、CD28、CTLA4、ICOS およびそれらのリガンド)はT細胞の活性化制御に重要な役割を果たす costimulatory 分子である。最近、このファミリーに属する分子としてPD-1が同定された。PD-1は活性化T細胞上に発現し、その特異的リガンドであるPD-L1およびPD-L2との会合を介してT細胞レセプターからのシグナルを阻害し、T細胞の活性化を抑制する機能を有することが知られている。BCG感染実験ではPD-L1の発現が上昇する感染3週間目以降にPD-1経路が活性化され、BCGに対する感染抵抗性T細胞の機能が阻害されることが示された。また逆に、BCGあるいはHIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスやLCMVなどのウイルス感染実験で、PD-1シグナル経路を遮断することにより宿主の感染抵抗性が亢進することが認められている。これらの結果から、PD-1欠損マウスは正常マウスよりも感染防御能が強いことが示唆される。しかし、PD-1欠損マウスは結核菌感染に対して感受性を示すことがわかっている。解析の結果、結核菌感染後のPD-1欠損マウスの肺では、著しい菌数の増加と組織障害を伴う強い炎症反応が誘導されていることが示された。しかし、その機序については今のところ明らかにされていない。そこで本研究では、PD-1欠損マウスが結核菌感染に感受性を示す原因を明らかにすることを目的として解析を行った。

B. 研究方法

結核菌感染実験

正常C57BL/6およびPD-1欠損マウスに結核菌(約300 cfu)を経鼻感染させ、その後のマウス生存数を調べた。さらに、感染後経時的に肺および脾臓をホモジナイズし、Middlebrook7H10寒天培地に塗抹後、3週間培養して得られたコロニー数より臓器内菌数を算出した。また、感染後経時的に肺および脾臓を採取し、その肉眼所見を比較した。さらに、HE染色および抗酸菌染色を施し、炎症および菌の増殖の程度を顕微鏡下で観察した。肺への炎症性細胞の浸潤を調べるため、感染後経時的に採取した肺をコラゲナーゼ処理した後、回収された細胞の

表面抗原をFACSで解析した。

サイトカインおよびケモカイン産生応答

結核菌感染後経時的に正常およびPD-1欠損マウスの肺を採取し、ホモジネートを作製した。ホモジネート中の各種サイトカイン量をELISAで測定した。また、感染後経時的に採取した肺よりRNAを抽出し、各種ケモカインの発現量をreal time RT-PCRで解析した。さらに、感染マウスの肺における抗原特異的Th1型T細胞の反応を調べるため、感染後経時的に肺よりT細胞を回収し、抗原提示細胞と共に特異的ペプチド抗原で刺激した。培養後、上清中に産生されるIFN- γ 量をELISAで測定した。また、IFN- γ 産生細胞の表面抗原をFACSで解析した。

マクロファージの機能解析

正常およびPD-1欠損マウスより骨髄細胞を採取し、M-CSFで刺激して骨髄マクロファージに分化させた。マクロファージを回収し、IFN- γ 存在下あるいは非存在下で培養後に結核菌を感染させ、感染直後と感染4日後の細胞内菌数を調べた。また、結核菌感染後に回収された培養上清中の各種サイトカイン、ケモカインおよびNO産生量を測定した。

T細胞移入実験

正常およびPD-1欠損マウスの脾細胞よりCD3⁺T、CD4⁺TおよびCD8⁺T細胞を回収し、RAG2欠損マウスに静脈内注射した。その後、結核菌を経鼻感染させ、マウスの生存数を観察した。

抗体を用いたIFN- γ 中和実験

正常およびPD-1欠損マウスに結核菌を経鼻感染させた。感染2—4週後に中和活性を有する抗IFN- γ 抗体を静脈注射し、その後のマウスの生存数を観察した。また、感染28日後に肺を採取し、肺内生菌数、マクロファージおよび好中球をはじめとする炎症性細胞の浸潤の程度、さらにサイトカインやケモカイン産生量を測定した。

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

PD-1 欠損マウスの結核菌感受性と肺の感染病態

正常マウスと PD-1 欠損マウスに結核菌を感染させたところ、正常マウスに比べて PD-1 欠損マウスは感染に対して感受性を示し、感染後早期に死亡した。結核菌感染後の PD-1 欠損マウスの肺では、マクロファージと好中球を中心とした炎症細胞の著明な浸潤と、各種炎症性サイトカインおよびケモカイン産生の亢進が認められ、壊死を伴う炎症性病変が多数観察された。さらに、PD-1 欠損マウスの肺では感染 21 日目以降著明な菌数の増加が観察された。一方、正常マウスでは PD-1 欠損マウスで見られる激しい炎症反応は認められず、感染 3 週目以降の菌の増殖を制御できることが示された。また、正常マウス由来 T 細胞上の PD-1 の発現は結核菌感染後 17-21 日目に認められ、I-A^b 陽性抗原提示細胞上の PD-L1 の発現は感染 21 日目以降に増加した。さらに、正常マウスと PD-1 欠損マウスにおいて感染 3 週目以前の肺内菌数に明らかな違いがないことが示された。これらの結果から、PD-1 欠損マウスでは感染 3 週目以降に発現する防御免疫が結核菌に対して過剰に反応するため、組織障害を伴う炎症反応が誘導され、菌の体内増殖を制御できない状態に陥っていることが示された。

In vitroにおけるマクロファージ機能解析

PD-1 欠損マウスが感受性を示す原因を特定するため、正常マウスと PD-1 欠損マウスのマクロファージ機能を比較した。結核菌感染後の菌の貪食能、および感染 4 日後の細胞内菌数を測定したが、正常マクロファージと PD-1 欠損マクロファージの間に違いは認められなかった。また、正常マクロファージは IFN- γ 刺激に反応して NO 産生が誘導され、結核菌の増殖を抑えることができるが、PD-1 欠損マクロファージも IFN- γ 刺激に対しては同様の反応を示した。さらに、結核菌感染後のサイトカインおよびケモカイン産生応答にも違いは認められなかった。一方、結核菌感染マウスの肺での iNOS 発現

量および NO 産生量は PD-1 欠損マウスの方が明らかに高いことから、PD-1 欠損の影響は、抗原特異的な T 細胞応答の違いによるものと考えられた。

T 細胞機能の比較

結核菌感染 3 週後の正常および PD-1 欠損マウスの肺における抗原特異的 T 細胞数を調べた。抗原特異的 CD8⁺ T 細胞数を TB10.4/H-2K^b を用いて解析した結果、TB10.4 特異的 IFN- γ 産生性 CD8⁺ T 細胞数は正常および PD-1 欠損マウスの肺に同程度に認められた。一方、ESAT6₁₋₂₀/I-A^b 特異的 IFN- γ 産生性 CD4⁺ T 細胞数は感染後の PD-1 欠損マウスの肺で明らかに増加していることが示された。これらの結果から、PD-1 欠損マウスの肺で観察される激しい炎症反応の原因が、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞による可能性が示された。そこで、正常および PD-1 欠損マウスより CD4⁺ T 細胞を回収し、RAG2 欠損マウスに移入した。その後マウスに結核菌を感染させ、120 日間の生存率を比較した。その結果、レシピエントである RAG2 欠損マウスは結核菌感染後早期に死亡したが、正常 CD4⁺ T 細胞を移入したマウスは全頭生存した。一方、PD-1 欠損マウスの CD4⁺ T 細胞を移入したマウスは全て死亡した。この結果から、PD-1 欠損マウスの CD4⁺ T 細胞は抗原を識別してサイトカインを産生する能力はあるが、それが正常マウスの CD4⁺ T 細胞とは異なり宿主防御に結びつかないことが示された。そこで、防御反応に必須な IFN- γ に対する中和抗体を投与し、感染後の宿主防御反応の変化について解析した。その結果、抗 IFN- γ 抗体により結核菌感染後の PD-1 欠損マウスの肺で産生される IFN- γ を正常マウスのレベルまで低下させると、炎症反応が改善され、肺内の菌の増殖を正常マウスと同様に制御できることが示された。

D. 考察

本研究では、PD-1 欠損マウスが結核菌の感染に対して感受性を示す原因を調べた。結核菌感染後の正常マウスと PD-1 欠損マウスの防御免疫応答の違いから、PD-1 欠損マウスでは抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の肺への集

積と、その IFN- γ 産生能が著しく亢進していることを見出した。その結果、PD-1 欠損マウスの肺では結核菌感染後に CD4⁺ T 細胞から多量の IFN- γ が産生され、防御応答全体が過剰に活性化されてしまい、感染した菌を排除できない状態に陥っていることが明らかとなった。従って、PD-1 シグナル経路は、結核菌感染後の宿主防御免疫を適切に発現させるための重要な役割があることが示された。PD-1 シグナル経路は、自己免疫疾患の発症を抑えるための免疫抑制システムとして見いだされ、最近の研究では、長期間宿主体内で生存可能なウイルスや細菌の感染成立に関与していることが報告されている。また、これまでの解析から我々は、BCG 感染実験系では PD-1 経路を阻害することで菌の排除が亢進することを明らかにした。さらに、PD-1 欠損マウスがリステリア感染に対して抵抗性を示すことが示されている。これらの結果は、PD-1 シグナル経路が宿主免疫応答に対して抑制的に働くことを示している。一方、結核菌の感染では PD-1 による抑制が解除された場合には、感染後に誘導される防御免疫を制御することができず、宿主感染防御機構の崩壊に繋がること明らかとなった。これらの結果は、病原体によって感染防御における PD-1 経路の要求性が異なることを示すものである。今後さらに結核感染防御における PD-1 経路の負の面を分子レベルで解明し、そのワクチン開発への応用の可能性について検討していく予定である。

E. 結論

結核菌を感染した PD-1 欠損マウスの肺では細胞死を伴った過剰な炎症反応が惹起され、感染した菌の増殖をコントロールすることができない。これは、本来感染防御を担うべき抗原特異的 CD4⁺ T 細胞が感染に対して過剰な応答を示した結果であり、CD4⁺ T 細胞が産生する大量の IFN- γ を正常レベルに下げただけで、結核に対する抵抗性が正常レベルにもどることが示された。従って、PD-1 シグナル経路は結核菌の初感染後に誘導される宿主感染防御を正常に維持するた

めに重要な役割を果たしていることが明らかになった。

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

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
河村伊久雄	結核菌・抗酸菌感染防御機構	河内英明	日本臨床特集 結核とその類縁疾患 -基礎と臨床の最新知見-	日本臨床社	大阪	2011	1340-1344

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Nakanaga, Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, N. Ishii.	Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010.	J. Clin. Microbiol.	49	3829-3836	2011
T. Naka, N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, N. Fujiwara.	Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	J. Bacteriol.	193	5766-5774	2011
Y. Fukutomi, Y. Maeda, M. Makino.	Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages.	Antimicrob Agents Chemother.	55	4000-4005	2011
M. Kai, N. H. Ngvyen Phvc, H. A. Ngvyen, T. H. Pham, K. H. Ngvyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, T. T. Ngvyen.	Analysis of drug-resistant strains of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.	Clin. Infect. Dis.	52	e127-e132	2011
Y. Tsukamoto, M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, M. Makino.	Immunostimulatory activity of major membrane protein II from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Clin. Vaccine Immunol.	18	235-242	2011
N. Nakata, M. Kai, M. Makino.	Mutation analysis of the <i>Mycobacterium leprae folPI</i> gene and Dapsone resistance.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	55	762-766	2011

K. Nakanaga, Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, N. Ishii.	Multiple cases of cutaneous <i>Mycobacterium massiliense</i> infection in a “hot spa” in Japan.	J. Clin. Microbiol.	49	613–617	2011
H. Saiga, Y. Shimada, K. Takeda.	Innate immune effectors in mycobacterial infection.	Clin. Dev. Immunol.	2011	347594	2011
Y. Maeda, T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, M. Makino.	A lipopeptide facilitate induction of <i>Mycobacterium leprae</i> killing in host cells.	PLoS Neglected Tropical Diseases	5	e1401	2011
S. Mori, K. Shibayama, J. I. Wachino, Y. Arakawa.	Structural insights into the novel diadenosine 5',5'''-P ^α ,P ^β -tetrphosphate phosphorylase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	J. Mol. Biol.	410	93-104	2011
S. Daim, I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Kurenuma, Y. Shen, S.R. Dewamitta, S. Sakai, T. Nomura, H. Qu, M. Mitsuyama	Expression of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PPE37 protein in <i>Mycobacterium smegmatis</i> induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages	J. Med. Microbiol.	60	582-591	2011
K. Nakanaga, Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, N. Ishii.	<i>Mycobacterium pseudoshottsii</i> isolated from 24 farmed fishes in western Japan.	J. Veterinary Medical Science	in press		2011

K. Nakanaga, Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, N. Ishii.	<i>Mycobacterium shigaense</i> 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		2011
H. Ariga, H. Nagai, A. Kurashima, Y. Hoshino, S. Shoji, Y. Nakajima.	Stratified Threshold Values of QuantiFERON Assay for Diagnosing Tuberculosis Infection in Immunocompromised Populations.	Tuberculosis Research and Treatment	in press		2011
T. Otsuki, S. Izaki, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, K. Osamura.	Cutaneous Mycobacterium massiliense infection: a sporadic case in Japan.	J. Dermatol.	in press		2011
H. Onoe, K. Nakanaga, R. R. Yotsu, Y. Hoshino, N. Ishii, T. Takeuchi.	Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient	J. Dermatol.	in press		2011

日本臨牀 第69巻・第8号（平成23年8月号）別刷

特集：結核とその類縁疾患

図説：結核菌・抗酸菌感染防御機構

河村伊久雄



結核菌・抗酸菌感染防御機構

Protective immunity to mycobacterial infection

河村伊久雄

はじめに

結核菌は宿主に感染後速やかにマクロファージに貪食されるが、その細胞内殺菌機構を制御して細胞内で増殖する。また、結核菌は感染細胞の細胞死およびシグナル伝達経路を修飾することで、その細胞内環境を生存増殖に適したものにする能力を有し、宿主防御免疫に抵抗して持続感染を成立させる。一方、結核菌が感染した宿主では感染3-4週間後には強い細胞性免疫が誘導され、感染初期にみられる菌の増殖は抑えられる。しかし、結核菌に対して過剰な免疫応答が誘導された場合には、正常組織が破壊され、結核症に特有な病像が現れる。このように、結核に対する感染防御では宿主免疫応答を適切に制御することが重要な要素となる。

1. 食細胞による異物識別と自然免疫応答の誘導

マクロファージや樹状細胞(dendritic cell: DC)は細胞表面の toll-like receptor (TLR) を介して結核菌を識別する¹⁾(図1)。TLR2は結核菌のリポ多糖体成分である lipoarabinomannan (LAM) や phosphatidylinositol-mannoside (PIM)、あるいはリポタンパク質を認識する。また、結核菌感染ではTLR4およびTLR9経路も活性化することから、これらレセプターに対するリガンドが存在することが示されている。更に、Cタイプレクチンである dectin-1 や mincle、更に細胞質内の nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) が結核菌の侵入を感知するセンサーとして働く。これらレセプターからのシグナルはマクロファージやDCを活性化し、アポトーシスやオートファジーを誘導する。また、結核菌感染はインフラマソーム形成を介したカスパーゼ1の活性化を誘導する。その結果、産生された炎症性サイトカインやケモカインは感染局所への炎症性細胞の動因や、肉芽腫形成に関与する。

2. 肺におけるT細胞への抗原提示

肺に侵入した結核菌を取り込んだ肺胞マクロファージは、所属リンパ節に移動する能力が低い。このためT細胞への抗原提示には、感染局所で産生されるケモカインや炎症性サイトカインにより動員されるDCが必要になる(図2)。一方、結核菌は感染マクロファージのリポキシンA4産生を誘導し、プロスタグランジンE₂産生を抑制する。このため、感染マクロファージのミトコンドリア内膜が傷害され、細胞がネクローシスに陥り、菌の増殖を許す結果となる²⁾。これに対して弱毒株の感染ではリポキシンA4産生が誘導されないため、感染細胞ではアポトーシス経路が活性化され、菌の増殖は阻害される。この菌の病原性に関連した感染細胞の細胞死制御のメカニズムは、結核菌が持続感染を成立させるために重要であると考えられる。

Ikuo Kawamura: Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine 京都大学大学院医学研究科 微生物感染症学

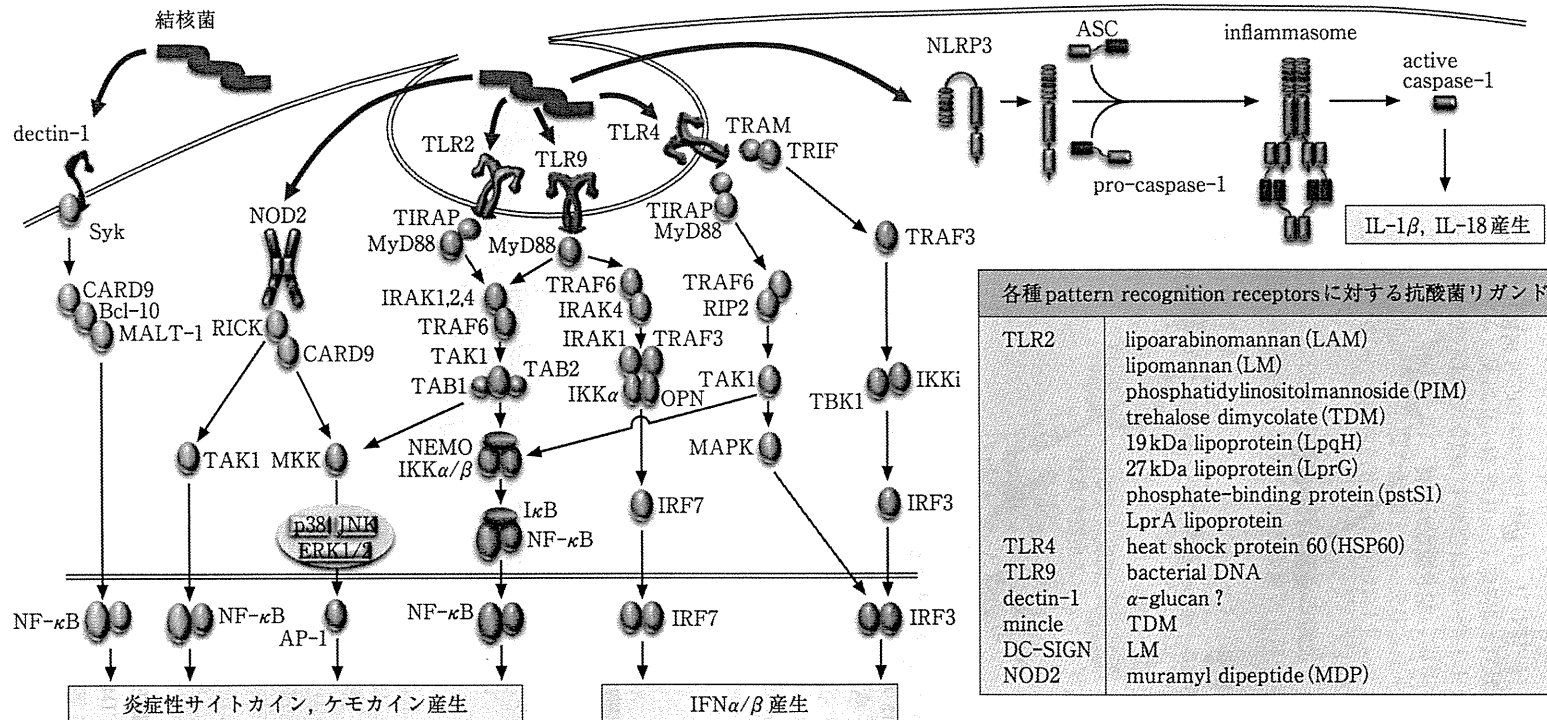


図1 結核菌感染により活性化されるシグナル伝達経路と結核菌リガンド

マクロファージやDCはTLR2, TLR4およびTLR9で結核菌体成分を認識する。また、Cタイプレクチンであるdectin-1やmincleも菌体成分の識別に関与する。更に、細胞質内に存在するNOD2はMDPを認識するセンサーとして働く。これらレセプターとリガンドの結合はそれぞれのシグナル経路を活性化し、炎症性サイトカイン、ケモカインあるいはI型インターフェロン産生を誘導する。また、結核菌はNLRP3インフラマソームの形成を誘導してカスパーゼ1を活性化する。その結果、感染細胞ではピロプトローシス経路が刺激されてIL-1 β およびIL-18産生が誘導される。

AP-1: activator protein 1, ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, Bcl: B cell lymphoma, CARD: caspase recruitment domain, ERK: extracellular signal-regulated kinase, I κ B: inhibitor of κ B, IKK: I κ B kinase, IRAK: IL-1R-associated kinase, IRF: interferon regulatory factor, JNK: c-jun N-terminal kinase, MALT: mucosa-associated lymphoid tissue, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MKK: MAPK kinase, MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88, NEMO: NF- κ B essential modifier, NF- κ B: nuclear factor kappa B, NLRP: NOD like receptor family, pyrin domain containing protein, OPN: osteopontin, RICK: RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase, RIP: receptor-interacting protein, Syk: spleen tyrosine kinase, TAB: TAK1-binding protein, TAK: transforming growth factor β -activated kinase, TIRAP: TIR domain-containing adapter protein, TRAF: TNFR-associated factor, TRAM: TRIF-related adapter molecule, TRIF: TIR-containing adapter inducing IFN β .

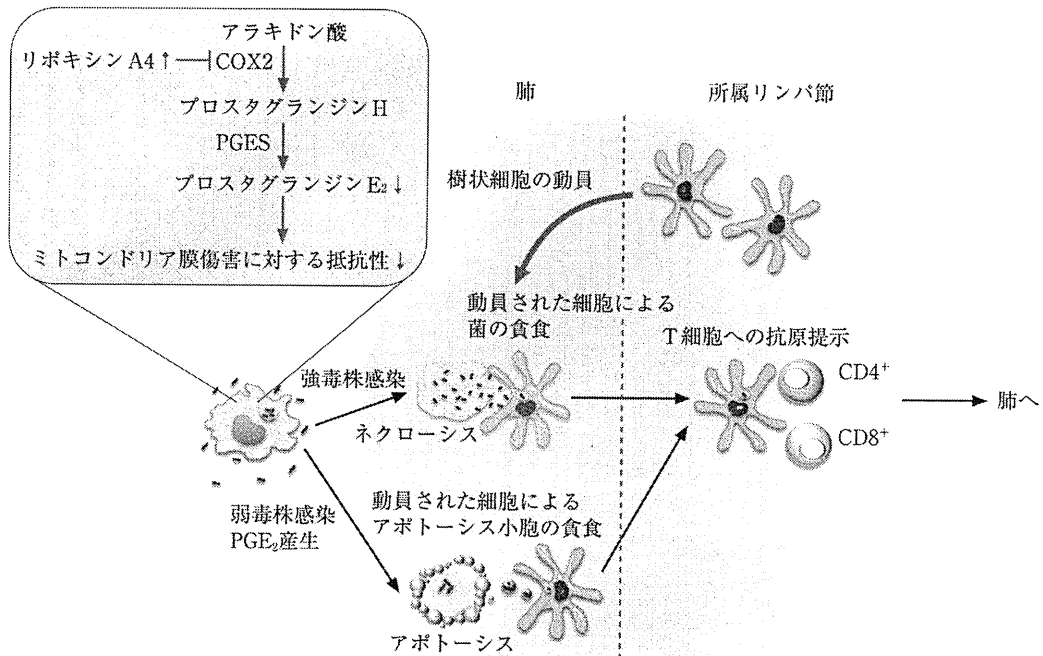


図2 結核菌感染後の肺における抗原提示

結核菌を貪食した肺胞マクロファージは、所属リンパ節に移行する能力が低い。そこで抗原特異的T細胞を誘導するためには、感染の刺激で肺に動員されるDCが結核菌抗原や菌体を取り込み、所属リンパ節に存在するT細胞に抗原提示する必要がある。また、病原性の強い結核菌は感染細胞のリポキシンA4合成を誘導してミトコンドリア膜傷害に対する抵抗性を下げる。その結果、感染細胞はネクロシスに陥り、菌の増殖が可能になる。一方、弱毒株の感染ではリポキシンA4合成は誘導されず、感染細胞にはアポトーシスが誘導されて菌の増殖が阻害される。

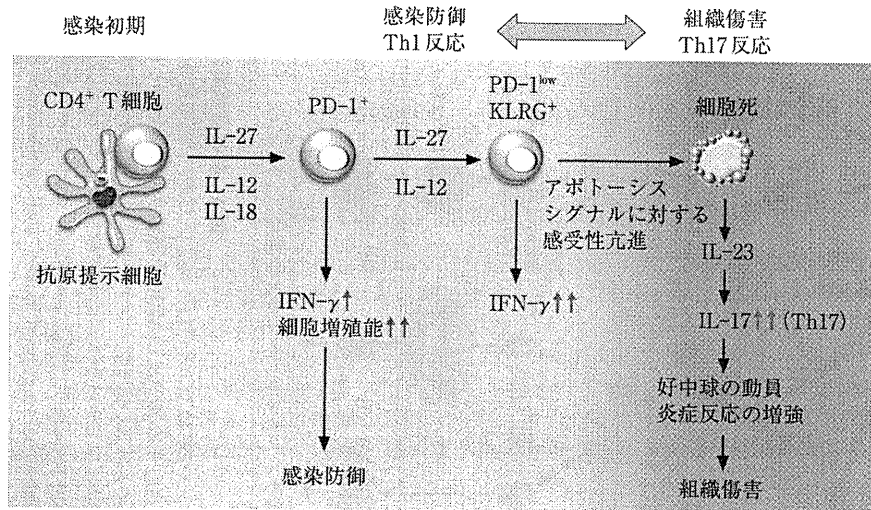


図3 感染防御免疫におけるTh1/Th17バランスの重要性

抗原提示を受けたCD4⁺T細胞は防御免疫を担当するPD-1⁺CD4⁺T細胞およびPD-1^{low}KLRG⁺CD4⁺T細胞に分化する。一方、これらT細胞が減少した場合には感染局所でIL-23およびIL-17産生が亢進し、Th17型の組織傷害が引き起こされる。結核の慢性感染をコントロールするためには、Th1/Th17のバランスが重要である。

3. 抗原特異的T細胞応答

CD4⁺T細胞は抗原提示を受け、programmed death-1⁺(PD-1⁺) killer cell lectin-like receptor G1⁻(KLRG1⁻) CD4⁺T細胞に分化する。更にIL-12やIL-27の持続的な刺激を受けるとPD-1^{low} KLRG1⁺ CD4⁺T細胞が出現する^{3,4)}(図3)。PD-1^{low} KLRG1⁺ CD4⁺T細胞は強いサイトカイン産生能を有するが、アポトーシスシグナルに感受性で増殖能が低い。一方、これら防御免疫に関与するT細胞が減少した場合には、感染局所でIL-23やIL-17産生が増加し、好中球の浸潤と強い炎症反応を伴うTh17型の組織傷害が誘導される。したがって、これら抗原特異的CD4⁺T細胞(Th1/Th17)のバランスを保つことが感染防御の観点から重要になる。

また、結核に対する感染防御にはCD4⁺T細胞以外に異なる機能を有する様々な細胞が関与することがわかっている(図4)。これら免疫担当細胞の機能を適切にコントロールすることが、結核に対する感染防御能を高めるために必要である。

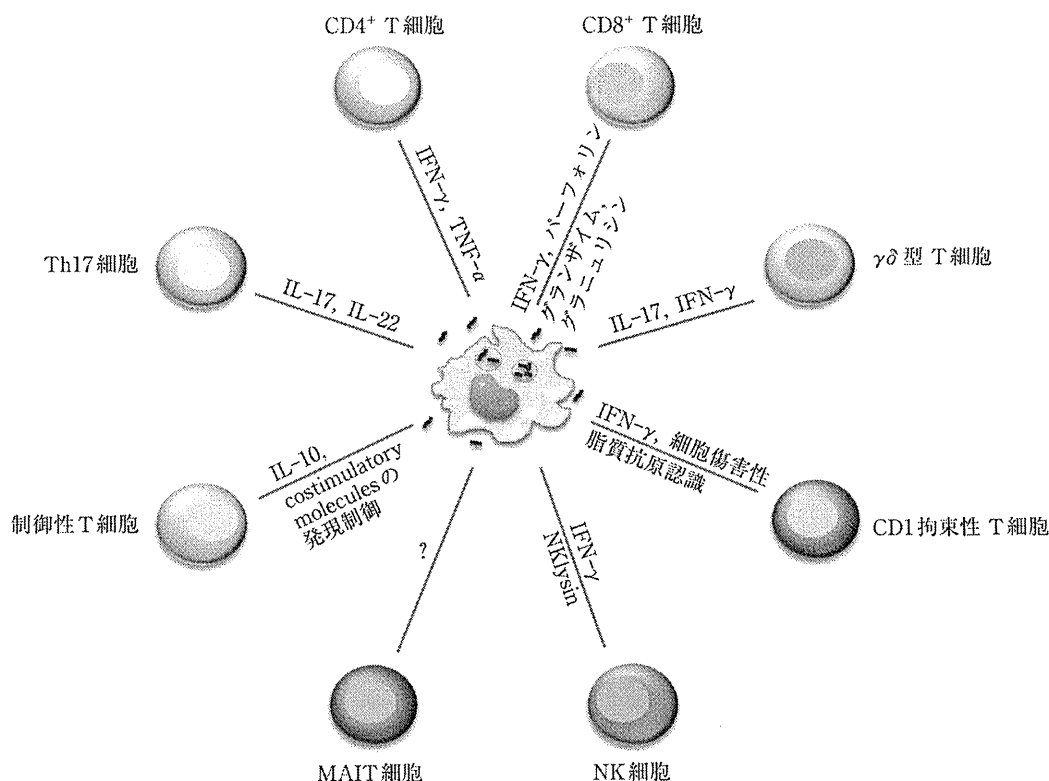


図4 結核菌に対する感染防御に関与する免疫担当細胞

結核に対する感染防御にはCD4⁺T細胞以外に様々な細胞が関与する。CD8⁺T細胞はIFN-γやグランジュリンを産生するとともにキラー活性を發揮して感染防御にかかわる。IL-17を産生するγδT細胞は肉芽腫形成に重要であり、natural killer T細胞や一部のCD8⁺T細胞はCD1拘束性に脂質抗原を認識する。NK細胞はIFN-γ産生細胞として初期防御に関与する。また最近、mucosally associated invariant T(MAIT)細胞が感染防御に関与することが示されている。一方、Th17細胞は組織傷害を引き起こし、制御性T細胞は宿主防御免疫を抑制する。これら免疫担当細胞の機能を適切に制御することが、結核に対する感染防御に重要である。

文 献

- 1) Kawai T, Akira S: The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**: 317-337, 2009.
- 2) Behar SM, et al: Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* **8**: 668-674, 2010.
- 3) Reiley WW, et al: Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 19408-19413, 2010.
- 4) Torrado E, et al: Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol* **32**: 66-72, 2011.

Nineteen Cases of Buruli Ulcer Diagnosed in Japan from 1980 to 2010[∇]

Kazue Nakanaga,^{1*} Yoshihiko Hoshino,¹ Rie Roselyne Yotsu,² Masahiko Makino,¹ and Norihisa Ishii¹

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan 189-0002,¹ and Department of Dermatology, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan 162-8655²

Received 19 April 2011/Returned for modification 7 June 2011/Accepted 15 August 2011

The etiology, clinical manifestations, and treatment of 19 sporadic cases of Buruli ulcer (BU) in Japan are described. The cases originated in different regions of Honshu Island, with no evidence of patient contact with an aquatic environment. The majority (73.7%) of cases occurred in females, with an average age of 39.1 years for females and 56.8 years for males. All patients developed ulcers on exposed areas of the skin (e.g., face, extremities). Most ulcers were <5 cm in diameter (category I), except in one severe progressive case (category II). Pain was absent in 10 of the 19 cases. Fourteen ulcers were surgically excised, and nine patients needed skin grafting. All cases were treated with various antibiotic regimens, with no reported recurrences as of March 2011. *Mycobacterium ulcerans*-specific IS2404 was detected in all cases. Ten isolates had identical 16S rRNA gene sequences, which were similar to those of *M. ulcerans*. However, the *rpoB* gene showed a closer resemblance to *Mycobacterium marinum* or *Mycobacterium pseudoshottsii*. PCR identified pMUM001 in all isolates but failed to detect one marker. DNA-DNA hybridization misidentified all isolates as *M. marinum*. The drug susceptibility profile of the isolates also differed from that of *M. ulcerans*. Sequence analysis revealed “*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*” as the etiologic agent of BU in Japan. Clinical manifestations were comparable to those of *M. ulcerans* but differed as follows: (i) cases were not concentrated in a particular area; (ii) there was no suspected connection to an aquatic environment; (iii) drug susceptibility was different; and (iv) bacteriological features were different.

Buruli ulcer (BU) was first reported in 1935 as a series of unusual painless ulcers in a patient from southeast Australia (2). Thirteen years after the first report, the etiological agent of the ulcer was determined to be *Mycobacterium ulcerans*, a previously unknown mycobacterium (5, 14). During the 1960s, many *M. ulcerans* infections were reported in Uganda, especially in Buruli County, for which this disease was eventually named (3, 32). It is a necrotizing disease of the skin that mostly affects children, producing massive ulcers and permanent, disabling scars. At present, the disease is found primarily in West and Central Africa and in humid tropical areas: BU has been reported in 32 countries, and *M. ulcerans* infection is the third most common mycobacterial infection, after tuberculosis and leprosy. Treatment of progressive cases is difficult and generally requires surgery, usually accompanied by skin grafting and prolonged courses of antibiotics (21, 34).

The first reported case of BU in Japan occurred in 1980 in a 19-year-old woman who had never been abroad (15). The causative agent was isolated and classified as “*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*” because it was closely related to *M. ulcerans* (31). The disease was not seen again until a 37-year-old woman was affected in 2003 (10). The number of cases increased gradually, until 19 cases had been detected by December 2010 (K. Nakanaga, Y. Hoshino, and N. Ishii, presented at the WHO Annual Meeting on Buruli Ulcer, Geneva,

Switzerland, 22 to 24 March 2010). We conducted a comprehensive study using these 19 clinical samples and/or isolated bacteria. Etiology, differential diagnosis, clinical manifestations, and treatments are discussed in this report.

(The preliminary results of this study were presented by K.N. and R. R. Y. in the WHO Annual Meeting on Buruli Ulcer, Geneva, Switzerland, 28 to 30 March 2011.)

MATERIALS AND METHODS

Patients. The research protocol was approved by the institutional review board of the National Institute of Infectious Diseases, Japan. The BU diagnostic criteria were established prior to this study. The primary characteristic was the presence of a clinical lesion, which usually started as a painless subcutaneous nodule, and which secondarily ulcerated with characteristic undermined edges. Other preulcerative forms consisted of papules affecting only the skin, plaques (large, firm, painless, and raised lesions), and edema (a severe form of the disease). Apart from the clinical lesions, at least one of the following criteria must be included for a diagnosis of BU: (i) detection of acid-fast bacilli in a smear from a swab or a biopsy specimen after Ziehl-Neelsen staining, (ii) growth on 7H11 or Ogawa medium, (iii) histopathological confirmation, or (iv) PCR amplification of IS2404, an *M. ulcerans*-specific repetitive element. This article is a summary of all BU cases diagnosed to date in Japan. Some have already been published elsewhere as case reports in Japanese and/or English (6, 7, 10, 12, 16, 28, 35).

PCR, sequencing, and phylogenetic analyses. All PCRs targeting IS2404 (18) were performed on extracted DNA from one or more of the following: fresh skin biopsy specimens, a thin section of formalin-fixed, paraffin-embedded skin, and bacteria isolated from a skin lesion. Briefly, the PCR product, amplified using forward primer PU4F and reverse primer PU7Rbio (Table 1), was electrophoresed on a 2% agarose gel and was stained with ethidium bromide.

The sequences of the internal transcribed spacer between the 16S and 23S rRNA genes (ITS region) and of the 16S rRNA, *rpoB*, and *hsp65* genes were analyzed with the primers listed in Table 1. Amplified PCR products (sizes shown in Table 1) were directly sequenced using the ABI Prism 310 PCR genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) (16). Sequences were obtained for 1,475- or 1,478-bp (16S rRNA gene), 272-bp (ITS region), 315-bp (*rpoB*), and

* Corresponding author. Mailing address: Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama-shi, Tokyo 189-0002, Japan. Phone: 81-42-391-8211. Fax: 81-42-394-9092. E-mail: nakanaga@nih.go.jp.

[∇] Published ahead of print on 31 August 2011.

TABLE 1. Primer sequences

Primer	Sequence (5'-3')	PCR target (fragment size [bp])	Reference
PU4F PU7Rbio	GCGCAGATCAACTTCGCGGT GCCCCATTGGTGCTCGGTCA	IS2404 (154)	18
8F16S 1047R16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TGCACACAGGCCACAAGGGA	16S rRNA gene (1,515 or 1,518)	24
830F16S 1542R16S	GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		
ITSF ITSR	TTGTACACACCGCCCGTC TCTCGATGCCAAGGCATCCACC	16S-23S ITS region (ca. 340)	23
MF MR	CGACCACTTCGGCAACCG TCGATCGGGCACATCCGG	<i>rpoB</i> (341)	11
TB11 TB12	ACCAACGATGGTGTGCCAT CTGTGCAACCCGCATACCCT	<i>hsp65</i> (441)	30
RepAF RepAR	CTACGAGCTGGTCAGCAATG ATCGACGCTCGCTACTTCTG	<i>repA</i> in pMUM001 (413)	26
ParAF ParAR	GCAAGCTGGCAATGTTTAT GTCCGGTCTTGATAGGTCA	<i>parA</i> in pMUM001 (501)	26
MUP11F MUP11R	ACCACCAAGAGTGGAACTG TGTCGTGTCGAGGTATGTGG	Serine/threonine protein kinase in pMUM001 (479)	26
MLSlodF MLSlodR	GGGCAATCGTCCTCACTG CAAGGGCAGTCTTGATTAGG	<i>mls</i> load in pMUM001 (560)	26
MLSAT(II)F MLSAT(II)R	AACGTTGAATCCCGTTTTTG GCACCACAAAGGAACGTCTAA	<i>mlsAT(II)</i> in pMUM001 (504)	26
TEIF TEIR	ATTCAAACGGATGCGAACTG ACATTGCTGGACAAACGACA	Type II thioesterase in pMUM001 (500)	26
MUP045F MUP045R	CAGCAAGTAACGGTGGAAACA ACGTGGCCCAITTGCTTAG	Type III ketosynthase in pMUM001 (496)	26
P450F P450R	CCCACCTCGTCGTTAGTCAT GTGCTCGGTGATCCAGAAGT	P450 in pMUM001 (500)	26

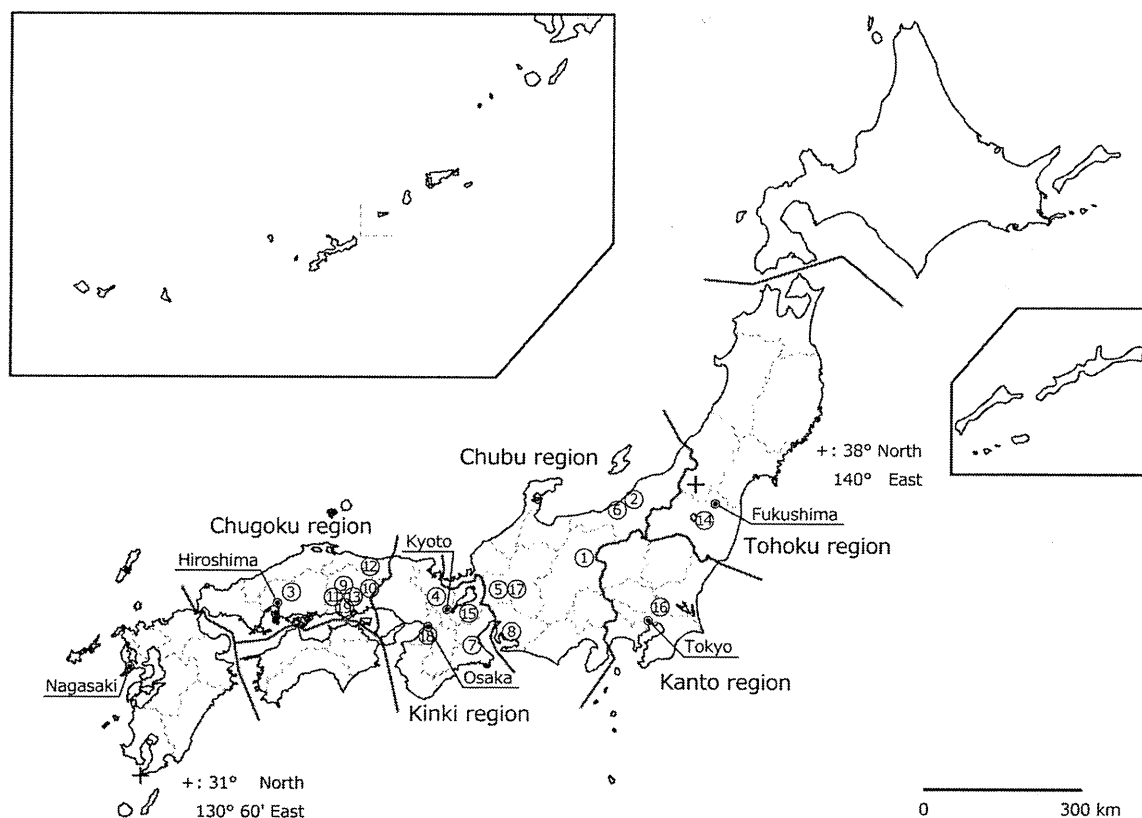


FIG. 1. Distribution of BU patients in Japan. Most of the patients lived in a typical temperate region, and all lived on the island of Honshu. The two plus signs on the map indicate 38°N, 140°E, and 31°N, 130°60'E, placing most of the island in the temperate zone.