

201204002A

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24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25(2013)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24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25(2013)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
薬剤耐性結核菌の迅速検出法 鈴木定彦（北海道大学）	17
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）	23
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）	29
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）	31
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）	37
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）	43
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）	47
結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究 小出幸夫（浜松医科大学）	53
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）	57
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）	63
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）	69

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）	73
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） ..	79
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）	83
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 柴山恵吾（国立感染症研究所）	89

研究成果の刊行に関する一覧表	91
----------------------	----

平成24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.

結核及びハンセン病は代表的抗酸菌感染症であり、太古の昔から人類を苦しめてきた慢性持続感染症である。一昔前には、両疾患はともに制圧可能と考えられ、日本国内においてはその研究を真摯に行う研究者の数も底をついた。しかし、その恐怖は未だに続いており、アジア諸国を含め基礎的研究を徹底的に行うべき疾患となっている。本研究班では、日本国のみならずアジア諸国の抗酸菌感染症の研究及び医療レベルの向上を念頭に置いた研究を展開したが、研究分野は多岐にわたり、予防法・治療法の開発、診断技術の向上、薬剤耐性菌の簡易診断技術の改良、分子疫学技法を用いたアジアの結核菌の拡がりや型別分類、慢性化機構の解析、抗酸菌感染症を重篤化させる宿主因子の解明、さらに、分子生物学・分子免疫学・分子細菌学に関する基礎的研究を行った。本研究班は単年度完結型であるため、毎年際立った研究成果を挙げることは決して容易ではないが、新しい研究を今後とも展開させるための方向性が垣間見え、日本人研究者の底力を示すことが可能であった。直接的にアジア諸国への技術移転も進んでおり、一定の成果が挙げられた。

研究分担者

光山正雄（京都大学・教授）
後藤正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）
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・副学長）
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）
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）
柴山恵吾（国立感染症研究所・部長）

A. 研究目的

BCG ワクチンによる予防法や第一世代及び第二世代の抗結核薬を組み合わせた化学

療法による結核・ハンセン病の制御は、ほぼ限界に至っている。本研究班では、結核菌の感染・伝播様式の解明、潜伏化・慢性

化・顕生化機構の解明、病態解明などの基礎的研究に加え、新規ワクチン開発による新たな予防方策の開発、迅速早期診断法の開発、迅速かつ簡便な薬剤耐性菌同定試験法の開発など実際的応用研究を併行させ包括的研究を行う。特に、高速解析手法が確立されたゲノム情報を効率的に利用し、さらに、作製が極めて容易となった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り発症するハンセン病についても、同様に感染病態に立脚した予防・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。ハンセン病研究を容易ならしめるため、らい菌への色素導入に必要な分子基盤を整備する。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、アジア諸国との外交関係が極めて重要であり、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。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、技術移転に必要なキット等の作製を急ぐ。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制圧を目指す上で、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、難治性結核患者の病態生理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、抗酸菌研究者の著しい減少は将来に大きな不安を残すため、若手研究者が魅力を感じず意識的対応を行う。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的応用として貢献することが期待できる。アジアとの連携及び若手研究者の育成の両面においてアジア諸国研究者を積極的に受け入れ、継続性のある共同

研究を樹立することがアジア諸国への貢献ともなる。

B. 研究方法

- 1) 免疫抑制性シグナル PD-1 の結核菌感染初期の抗結核菌感染防御反応に及ぼす影響を、結核菌感染後あるいは BCG ワクチン接種後マウスに PD-1 モノクローナル抗体を投与し、さらにワクチン接種抗体投与群には結核菌を感染させ、マウスの生存率、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生能を測定した（光山）
- 2) Th1 ペプチド刺激後の CD4 陽性 T 細胞の IL-17F 産生能を細胞内染色法で測定し、かつ IL-17F 産生性 CD4 陽性 T 細胞のフェノタイプを CD44 および CD62L に対するモノクローナル抗体を用いて検討した（田村）
- 3) 樹状細胞株を用いて、結核菌のオートファゴソーム形成機構をイメージ解析した（小出）
- 4) タイ王国において、潜在性結核感染症の検出系の確立を目的として、結核菌の休眠期病原に対する抗体応答を測定し、ケニア共和国において、潜在性結核菌感染と寄生虫感染症の相関関係について解析した（松本壮）
- 5) ネパールで分離された多剤耐性結核菌 109 株の薬剤感受性試験を行った。イソニアジド・リファンピシン・ストレプトマイシン・エタンブトール・カナマイシン・カプレオマイシンに対する感受性を検討し、Spoligotype および VNTR 解析を行い遺伝系統解析を行った（鈴木）
- 6) 台湾 CDC により分離されたイソニアジド（INH）耐性臨床分離株の遺伝子変異のスクリーニングを行い、過去に耐性関連変異と同定された変異との関係を検討した（柴山）
- 7) 抗結核剤パラアミノサリチル酸に対する耐性獲得機構について、Thy

- A・Thy X および cyclic-diGMP 代謝系酵素に着目して検討した (大原)
- 8) 抗酸菌症発症の発症および病態の進展は、宿主免疫の質と量に大きく左右され、同時に、宿主の免疫状態は種々の要因の影響を受ける。これら二次的要因の中で、宿主の代謝栄養状態と血液細胞中の免疫関連遺伝子の発現量との相関関係について、ベトナム国と国際共同研究を行った (慶長)
 - 9) カニクイザルに結核菌 Erdman 株 (500 CFU) を経気道感染させた後、HVJ-env/HSP65 + IL-12 DNA ワクチン、Granulysin DNA ワクチンの治療的効果を評価した (岡田)
 - 10) シャペロン効果を有する HSP70 と結核菌由来 Major Membrane Protein-II (MMP-II) をコードする遺伝子を連結させ、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に組み込ませることで新規リコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製し、BCG-DHTM の抗原提示細胞および T 細胞の活性化能をヒト末梢血を用いて検討した (牧野)
 - 11) インド国との共同研究で、24 種の化合物の抗菌活性を *M. smegmatis*・*M. bovis* BCG・*E. coli* をモデルとして測定した (瀧井)
 - 12) 結核菌株間の近似性・系統関係を正確に把握し、広域的な分子疫学・定着要因の究明など体系的な課題の解析に耐え得る「結核ゲノム疫学」を確立することを目指して、日本で広範に分離される VNTR 型別群「Branch 2」を用いた系統分類を行った (長谷)
 - 13) PE/PPE 遺伝子群に属し、*M. avium* subsp. *hominissuis* に特異的に存在する MAC PPE12 を用い、臨床分離由来の異なる 326 株を解析して *M. avium* の生存戦略を検討した (岩本)
 - 14) 肺結核の血清学的治療効果判定法

の開発を目的として、血清中の Leucin rich α 2 glycoprotein (LRG) を治療前後で測定し、喀痰塗抹培養検査との相関を検討した (松本智)

- 15) 新規抗抗酸菌薬の候補物質スクリーニングを迅速の内に、生菌を用いて行う方策を開発するため、Bioluminescent による発光マーカーの抗酸菌への導入方法を検討した (向井)
- 16) ブルーリ潰瘍における無痛誘導機序を解析する目的で、*M. ulcerans* が産生する毒性脂質 Mycolactone による培養シュワン細胞と線維芽細胞のアポトーシス誘導能を Caspase-3 の発現で検索した (後藤)

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 Consent)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. 結核菌感染マウスへの抗 PD-1 抗体の投与は、PD-1 欠損マウスの高結核菌感受性を再現した。しかし、本抗体の BCG 接種マウスへの投与では、BCG ワクチン効果は増強できず、PD-1 欠損マウスにおける抗 BCG 高生体防御反応の再現は得られず、更なる検討が必要であった (光山)。
2. IL-17F 産生細胞は Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であり、レ

ジデントメモリー様の分化形態を示した。さらに、CD4 陽性 T 細胞の IL-17F 産生量と CD8 陽性 T 細胞のグランザイム B 産生量は正の相関を示し、CTL 分化誘導に IL-17F は必須の因子であることが明らかとなった（田村）。

3. 結核菌感染樹状細胞では、感染 24 時間でファゴソームが形成され、さらに成熟化してオートファゴリソームを形成した。その結果、結核菌抗原が細胞表面に提示されることが明らかとなった。結核菌感染による T 細胞活性化機構の一端が明らかとなった（小出）。
4. 抗酸菌は 2 つのチミジル酸合成酵素 Thy A および Thy X の酵素活性のバランスによりパラアミノサリチル酸に対する耐性を獲得していた。また、cyclic-diGMP の代謝が耐性獲得に関与する可能性が示唆された（大原）。
5. カニクイザルにおいて治療的 DNA ワクチン投与効果は経皮ルートの方が経筋肉ルートに比し優れていた。15K Granulysin DNA ワクチンは、強い肉芽腫形成を誘導し、著明な延命に寄与することが可能であった。HSP65 + IL-12 DNA ワクチンは INH と相乗的治療効果を示した（岡田）。
6. BCG-DHTM はヒト末梢血由来樹状細胞・CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を強く活性化した。さらに、マウスに皮下接種すると二次刺激により大量の IFN- γ を産生する T 細胞を作出し、結核用ワクチンとして極めて有用と考えられた（牧野）。
7. 現行法である VNTR 型別法の高解像度を補完し、ゲノム情報から同定された臨床分離株の固有変異を遺伝マーカーとして用い、より体系的な研究展開を目指した。その結果、VNTR 型別群「Branch 2」株を用いた検討から、VNTR 型別では見出し得ない菌株間の相同性を把握することを可能とした（長谷）。
8. MAC PPE12 遺伝子は、多様性に富み、正の選択による新たな機能と構造の獲得を積極的にを行い、バリエーションに

富んだ祖先型と比較的近い過去に出現したものに大別されることが明らかになった（岩本）。

9. Leucin rich α 2 glycoprotein (LRG) の血清値は治療経過とともに低下し、喀痰塗抹培養検査と良い相関を示し、LRG 値は結核活動性のマーカーとして有用であった（松本智）。
10. 抗酸菌の codon usage を至適化したクローンが確立され、強い発光シグナルを検出する BCG が作製された。しかし、安定性に若干欠けており、改良の余地を残した（向井）。
11. 培養シュワン細胞および繊維芽細胞に Mycolactone A/B を作用させると、投与後短時間でシュワン細胞において強い Caspase-3 の発現が Western blotting 解析と蛍光抗体法で確認された。ブルーリ潰瘍における無痛性は、Mycolactone によるシュワン細胞のアポトーシスに起因することが判明した（後藤）。

(アジアへの貢献)

1. 中国人留学生に対し、細菌学・免疫学および分子生物学的手技を充分習得させることが可能であった。帰国後、自国における基礎・臨床研究において中心的役割を果たすことが可能となった（光山）。
2. タイ王国において、潜在性結核菌感染者の同定システムを確立する目的で、IFN- γ リリースアッセイ (QFT) 陽性者 (36 名) と陰性者 (20 名) の各種結核菌抗原 (ESAT6・CFP10・MDP1・Ag85・ACR) に対する抗体保有率を検討したが、両者に有意の差は認められなかった。また、アフリカケニア共和国において、小学生を対象として疫学調査を実施し、寄生虫 hookworm 感染率と潜在性結核菌保有率に相関があり、両者の因果関係が示唆された（松本壮）。
3. ネパールで分離された多剤耐性結核菌を解析したところ超多剤耐性結核

菌が 13 株分離され、これら耐性菌は北京株に分類され、ヒト-ヒト伝播で感染していることが判明した(鈴木)。

4. 台湾全土から収集されたイソニアジド (INH) 耐性株の変異を同定し、耐性との関連をプラスミドおよびリコンビナント蛋白を作製して検索した(柴山)。
5. ベトナム国の治療中の多剤耐性結核患者 58 名について、代謝栄養状態の指標として adiponectin・leptin・fetuin-A・RBP4 の血中濃度を測定したところ、adiponectin 濃度と IL12RB2・IL2・IL2A は Spearman の順位相関係数で中程度の負の相関を示し、adiponectin の高値は Th1 サイトカインとそのレセプターの発現減弱と相関していた。結核と栄養代謝免疫指標の間に密接な関連があることが示唆された(慶長)。
6. タイ国においては、結核患者血清中のグラニューライシン濃度は正常健常者に比し低いことが明らかとなった(岡田)。
7. 診断が極めて難しく血清診断など補助診断法が重要な位置を占める少菌型ハンセン病に対する血清診断法において用いることが可能な新規蛋白抗原として Major Membrane Protein-I (MMP-I) を同定した(牧野)。
8. インド国 Univ. Maharaja Krishnakumarsinhji Bravnagar から依頼された 24 種の化合物の抗菌活性について *M. bovis* BCG を用いて一次スクリーニングを行ったが、全て陰性であった(瀧井)。

D. 考察

多剤耐性結核菌及び多剤耐性らい菌は人類にとって新たな恐怖となっているが、日本では公衆衛生学的患者の制御が行き届いており、メディア等においても昨今大きな問題とはなっていない。しかし、日本の抗酸菌研究のレベル及び現状を考えると、いつまでも公衆衛生学的な技法に頼って左団

扇を扇いでいられる状況では決してない。アウトブレイクを阻止する有効なワクチンは存在しなく、多剤耐性抗酸菌を制御し得る薬剤の開発も急速な展開を示しているとは言いがたい。こうした問題を解決するための応用研究を推進させるためには、地に根を生やした充実した基盤的・基礎的研究が必要である。近年、分子生物学的技法及び分子疫学的技法が波及し、若手研究者にもアイディアさえあればきちんとした研究が展開できる科学的基盤が整備されつつある。こうした展開の中からいくつかの新事実が発見され、有効なワクチンの頻回投与は結核菌を確実に制御し得ることも判明した。さらに、頻回投与する追加免疫用ワクチンに求められる免疫学的特徴も明らかにされ、同時に BCG の改良型も考案された。行政サイドの協力が不可欠であるが、基盤的・応用的研究の成果が物を作る段階にまで引き上がってきたと考えられる。こうした成果をアジア諸国へ伝播させることは決して難しいことではなく、まず日本国内で一定の水準の物を作り上げ、アジア諸国へ輸出することが肝要かと考えられる。40 年以上にわたり、日米医学協力計画として培われてきた抗酸菌研究は、牛歩であっても確実に成果を挙げつつあると言える。

E. 結論

抗酸菌感染症に対する予防技術・治療技術の開発、病原体の伝播機構の解析、薬剤耐性菌の診断技術の開発、結核菌の迅速簡便遺伝子診断技術の開発に一定の成果が挙げられた。

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。

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24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.

多剤耐性結核菌の出現と伝播は、新たな脅威を結核菌に与えている。これに対抗するためには、ワクチンを含めた生体防御反応を賦活する方策を樹立することが重要である。ワクチンとして弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が用いられているが、BCG は成人肺結核の発症を予防することはできなく、改良型 BCG の作出が強く求められている。BCG が効かない最大の理由は、BCG が抗原提示細胞に感染するとファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止し、BCG 由来の抗原が十分に抗原提示細胞の表面に発現しないことにある。したがって、BCG に代わるワクチン、とりわけ改良型 BCG の作製にあたっては、新規 BCG が容易にライソゾームに移行し得る方策を BCG に組み込ませる必要がある。これまでにこの点について検討を加え、BCG からウレアーゼをコードする遺伝子を除去すること、BCG が積極的に結核菌由来の主要抗原を細胞内で分泌する能力を獲得することが有効であることを明らかにしてきた。さらに、新しい結核菌由来主要抗原として非病原性因子である MMP-II 蛋白が有用な役割を果たし得ることも明らかとなっている。そこで、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製し、その T 細胞活性化能を評価した。HSP70 は MMP-II 蛋白に対するシャペロン効果を有する。BCG-DHTM は、非常に強く樹状細胞・マクロファージ・ナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化した。また、マクロファージを介しての CD4 陽性 T 細胞の活性化を可能とした。さらに、BCG-DHTM は、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導を可能とした。また、C57BL/6 マウスに皮下接種すると、MMP-II に反応するメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生されることが判明した。

したがって、BCG-DHTM は、効率的にメモリー T 細胞を産生し、結核菌に対する生体防御反応を高めることが明らかとなった。

A. 研究目的

病原性抗酸菌に対する生体防御反応を賦活するためには、ワクチン候補分子を用いた抗原特異的メモリー T 細胞の産生が有用である。BCG は結核に対するワクチンとして、幅広く用いられてきたが、近年では、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ことが明らかとなっている。BCG は、本質的にナイーブ CD4 陽性 T 細胞

を活性化し、IFN- γ などのタイプ 1 サイトカインを産生を誘導するが、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化することができず、ワクチンとしては不十分である。BCG に改良を加えるにあたっては、その弱点を凌駕する方策を樹立しなければならない。BCG の最大の欠点は、抗原提示細胞に感染した際、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。したがって、

感染した BCG が効率的にライソゾームへ移行する方策を樹立することが重要となる。これまでに我々は、らい菌をモデルとして種々の方法でこの問題に取り組んできた。第1の方法は、BCGの有する *UreC* 遺伝子を除去し、*UreC* がコードするウレアーゼを取り除くことで、ファゴゾーム内のアンモニアの産生を抑制し、結果としてファゴゾームの酸性化を促進することでライソゾームとの融合を容易にした。第2の方法は、BCGに積極的に免疫原性のある主要抗原を分泌させ、分泌された抗原がライソゾームへ取り込まれ易い状況を作成することである。これまでに主要抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) を用い、さらに、シャペロン効果を有しアジュバント活性を持つ heat shock protein (HSP) 70 を併用することが、BCGのT細胞活性化能を増強することを明らかにしてきている。すなわち、HSP70 遺伝子と MMP-II 遺伝子を融合させ、これを BCG に遺伝子導入することである。二つの方策は何れも有効であって、*UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG (BCG- Δ UT) は CD4 陽性 T 細胞の活性化に有効であり、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG は CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞の両者の活性化に有効であった。さらに両方法を組み合わせ、BCG- Δ UT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入したリコンビナント BCG を作製すると、T 細胞活性化能とメモリーT細胞の産生能ともに増強することが可能であった。結核菌の免疫原性蛋白として ESAT6・CFP10・Ag85complex などが用いられ、ワクチンの開発に利用されてきた。しかし、これらの分子を用いたワクチンでは一定の効果が確認できるものの、その効果は十分ではなく、更なる改良が望まれている。一方、我々は、結核菌由来の MMP-II 蛋白は強い T 細胞活性化能を有していて、主要抗原の一つと考えられることを報告してきた。そこで、*UreC* 遺伝子欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 と結核菌由来 MMP-II の遺伝子を融合させ組み込ませた新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製し、その T 細胞活性化能を評価することを目的とした。

B. 研究方法

UreC 遺伝子欠損リコンビナント BCG に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製した。正常健康人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはベクターコントロール BCG (BCG-261H) を感染させ成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 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- γ および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、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- γ 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。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を MHC 抗原に対する抗体および CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-DHTM 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- γ の産生量により評価した。さらに、BCG-DHTM のメモリーT細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM および BCG-261H を皮下接種し、4 週間後に脾臓を摘出し、脾中 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激した際に、細胞内に IFN- γ を産生している細胞

を FACSCalibur を用いて測定し算出した。さらに、BCG-261H 及び BCG-DHTM 1×10^4 CFU を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週間後に結核菌 H37Rv を 10-100 CFU/lung で噴霧感染し、6 週間後に肺を機械的に処理し、コロニーアッセイで肺内の結核菌数を測定した。

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

コントロール BCG としてベクターコントロール (BCG-261H) を用いて、BCG-DHTM のナイーブ T 細胞の活性化能を検討した。BCG-DHTM は、非常に強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。BCG-DHTM はマクロファージを介してもメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。これら樹状細胞及びマクロファージを介した BCG-DHTM による CD4 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-DHTM を感染させた抗原提示細胞を HLA-DR あるいは CD86 抗原に対する抗体で処理すると、その活性化は 90%以上抑制された。次いで、BCG-DHTM のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化を検討すると、BCG-DHTM は、強くナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化し IFN- γ の産生を誘導した。この T 細胞の活性化は抗原特異的であって、BCG-DHTM 感染樹状細胞表面を抗 HLA-ABC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると、その T 細胞活性化能は強く抑制された。BCG-DHTM の T 細胞活性化機構を解析するため、BCG-DHTM の抗原提示細胞活性化能を評価した。BCG-DHTM は強く樹状細胞を刺激し、大量の IL-12p70・IL-1 β ・TNF α の産生を誘

導した。また、BCG-DHTM は樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。BCG-DHTM による T 細胞活性化機構をより詳細に検討する目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後 BCG-DHTM を感染させると、BCG-DHTM の感染によって誘導される MMP-II の発現が著しく抑制され、同時に、BCG-DHTM によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化が有意に抑制された。マクロファージによる CD4 陽性 T 細胞活性化もクロロキニン処理で抑制された。一方、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理しても、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は同様に抑制された。このことから、BCG-DHTM は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、分泌された融合タンパクが CD4 陽性 T 細胞の活性化と CD8 陽性 T 細胞の活性化をもたらし、CD8 陽性 T 細胞の活性化はクロスプレゼンテーション機構によって生じているものと考えられた。CD4 陽性 T 細胞存在下で CD8 陽性 T 細胞を BCG-DHTM で刺激すると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性実効型 T 細胞が産生され、さらに、遊走能マーカーを有するメモリー T 細胞が産生された。また、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM を皮下接種すると、効率良く MMP-II あるいは HSP70 に反応し、IFN- γ を産生するメモリー T 細胞が産生された。その効果は長期持続した。さらに、BCG-DHTM と BCG-261H の結核に対するワクチン効果を検討したところ、BCG-DHTM は BCG-261H に比し、有意に結核菌の増殖を抑制し、従来の BCG に比しより強いワクチン効果を有することが判明した。

アジア諸国への国際貢献

ハンセン病濃厚流行地域を抱えるアジアの国々への貢献のため、少菌型ハンセン病補助診断法に用いる新たな抗原の樹立を目指した。少菌型ハンセン病は、病変部位に肉眼的にらい菌の存在を確認することが難しいため、補助診断法である血清診断法に大きな比重がかかっている。当部では、これまで血清診断用抗原として MMP-II 抗原を同定し、広く世界で利用されるに至って

いるが、MMP-II の少菌型ハンセン病診断効率は 40～50%である。そこで、更なる抗原の同定を目的として MMP-I に着目し、その有効性を検討した。その結果、MMP-II と MMP-I の両者を用いると少菌型ハンセン病の診断効率が相加的に上昇することが判明した。

D. 考察

結核菌に対するワクチン作製においては、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、それぞれのメモリー T 細胞を産生することが必須である。両サブセットの T 細胞を効率的に産生するためには、ワクチン分子は T 細胞活性化に秀でている樹状細胞を強く活性化することが求められる。しかし、これまで用いられていた ESAT6・CFP10 といった分子は獲得免疫を活性化する能力は持っているものの、樹状細胞の活性化等自然免疫応答はむしろ抑制してしまう欠点を持っている。この点結核菌由来 MMP-II はらい菌由来 MMP-II 同様、TLR2 を介し樹状細胞を活性化し得ることがこれまでの検索で明らかとなっている。したがって、MMP-II はワクチン主要分子としてより有効に作用するものと期待される。一方、ワクチンとして用いられてきた現行の BCG では、どちらの T 細胞をも強く活性化する能力が弱く、そのため改善が求められている。T 細胞を充分活性化し得ない最大の原因は、BCG が抗原提示細胞に取り込まれた場合、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で、機能的な Phago-lysosome を形成し得ないことにある。この欠点を凌駕するため、二つの大きな試みを行ってきた。一つは、BCG 感染ファゴゾームを酸性化することでライソゾームとの融合を促進させることであり、この目的のため *UreC* 遺伝子を欠損させたところ、CD4 陽性 T 細胞を強く活性化し、メモリー CD4 陽性 T 細胞の産生が可能となった。第二の試みは、ファゴゾームの中でタンパクを分泌させることであった。分泌されたタンパクにより、CD8 陽性 T 細胞がより強く活性化されることを期待し、抗酸菌主要抗

原である MMP-II と HSP70 を融合させファゴゾームの中で分泌させると、期待した通り、この融合タンパク特異的に CD8 陽性 T 細胞が活性化された。さらに、両方法を組み合わせると両方策は相乗作用を示し、より強く両サブセットの T 細胞を活性化することが可能であった。MMP-II はらい菌由来であっても結核菌由来であっても同様に強い T 細胞活性化能を有していることが明らかとなった。さらに、BCG-DHTM の結核菌生体内増強抑制効果は従来の BCG に比し強いことが判明した。日本国内で初めて BCG に比し有効に作用するワクチンが作製された。

E. 結論

ウレアーゼ欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 遺伝子と結核菌由来 MMP-II 遺伝子を連結した遺伝子を導入すると効率的にメモリー T 細胞を産生することが可能となり、結核菌に対する生体防御反応を賦活することが可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2012. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 2008–2013.

2. 学会発表

- 1) Makino, M. Development of vaccine for mycobacterial diseases. Symposium on Research and Quality Control of Vaccine. 20 February, 2012, Beijing, China.
- 2) 鈴木幸一, Yang Degang, 石藤雄子, 大塚幹夫, 塘 忠顕, 斎藤一二三, 小林陸生, 赤間 剛 原 武史, 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. Buruli 潰瘍家族発生例の住居敷地内からの *Mycobacterium ulcerans* DNA 検出. 第 85 回日本ハンセン病学会

- 総会・学術大会 2012年6月 札幌市
- 3) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
- 4) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
- 5) Degang Yang, Takeshi Akama, Takeshi Hara, Yuko Ishido, Masahiko Makino, Norihisa Ishii, and Koich Suzuki. Clofazimine modulates the

expression of lipid metabolism in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市

- 6) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソソームの解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市

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24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）
酒井 俊祐 （京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・研究生）
屈 慧新 （京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・研究生）
須 艶婷 （京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・大学院生）

研究要旨.

PD-1 欠損マウスを用いた解析から、PD-1 を介したシグナルが結核菌感染初期の宿主感染防御応答の制御に重要であることが明らかとなった。一方、BCG に対する感染防御および BCG のワクチン効果は、PD-1 シグナル経路を阻害することにより増強することが示された。これらの結果は、PD-1 シグナル経路の制御が結核菌に対する感染防御の発現を調節する上で重要な要素となり、その制御が結核に対する適切な感染防御応答の発現を可能にすることを示唆している。そこで本年度は、抗 PD-1 抗体を用いて PD-1 シグナル経路を阻害した場合の抗結核感染防御への影響について検討した。正常マウスに結核菌を経鼻感染させると、感染約 1 年後にマウスはすべて死亡した。結核菌感染後に抗 PD-1 抗体を投与すると、結核菌感染のみの群と比較して感染初期の炎症性サイトカインやケモカイン産生および臓器内菌数の増加が認められ、感染約 300 日後にマウスはすべて死亡した。一方、予めマウスを BCG 免疫し、その 4 週後に結核菌を感染させると、結核菌単独感染の場合に比較して菌数の明らかな低下と炎症性サイトカインやケモカイン産生量の減少が認められた。また、結核菌感染 400 日後のマウスの生存率は 60%であった。BCG 感染後に抗 PD-1 抗体を投与し、その 4 週後に結核菌を感染させた場合、BCG 免疫のみの群と同程度のサイトカインおよびケモカイン産生が認められ、結核菌感染後のマウスの生存率は 80%であった。これらの結果から、BCG 免疫に抗 PD-1 抗体を併用することにより、BCG ワクチン効果が亢進する傾向にあることが示されたが、抗 PD-1 抗体の効果を明らかにするためにはさらなる検討が必要であることが示された。

A. 研究目的

PD-1 は、アポトーシスに陥った T 細胞の表面抗原として同定された。その後の解析から、PD-1 は活性化した T 細胞や B 細胞に発現すること。また、機能不全に陥った CD4⁺ T 細胞に恒常的に発現していることが示された。さらに、PD-1 はレセプターとしての機能を有し、2 種類の特異的リガンド (PD-L1 と PD-L2) が存在することが明らかとなった。それらリガンドのうち、PD-L1 は多様な細胞に発現が認められるが、PD-L2 は活性化

した樹状細胞やマクロファージに発現する。さらに、抗原提示細胞上の PD-L1 の発現は、IFN- γ や TLR リガンドの刺激により亢進することが報告されている。PD-1 経路の機能解析から、抗原提示細胞が T 細胞に抗原を提示する場合、PD-1 と PD-1 特異的なりガンドの結合が T 細胞に抑制性シグナルを伝達することが明らかにされている。この抑制性シグナルは、末梢組織において自己免疫反応を抑制し、免疫寛容を維持するために必要である。一方、リンパ球性脈絡髄膜

炎 ウ イ ル ス (lymphocytic choriomeningitis virus), ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus) や B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus) などの慢性ウイルス感染では、PD-1 を介した抑制性シグナルは病原体の排除を阻害することが示されている。これらの実験成績は、PD-1 シグナル経路の活性化が T 細胞機能を制御して組織傷害を抑えるために重要であるが、逆に慢性感染した病原体の排除を困難にする原因になることを示している。

抗結核感染防御における PD-1 シグナル経路の役割を明らかにするため、PD-1 欠損マウスを用いて結核菌感染実験を行った。その結果、正常マウスに比較して PD-1 欠損マウスは結核菌感染に感受性であり、感染 3 週目以降の肺における菌の増殖をコントロールできないことがわかった。組織学的解析の結果、結核菌感染 4 週後の PD-1 欠損マウスの肺では、多数の結節が観察された。また、その内部ではマクロファージや好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤と壊死を伴う炎症性領域が多数認められ、各種サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-17A) やケモカイン (MCP-1、MIP-1、CXCL1) 産生の増強が認められた。これらの結果から、結核感染後の急性期の肺では PD-1 を介したシグナルが過剰な炎症性反応を抑制して正常レベルの防御免疫を誘導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。一方、BCG を正常および PD-1 欠損マウスに感染させ、経時的に抗原特異的 T 細胞によるサイトカイン産生と臓器内生菌数を測定したところ、PD-1 欠損マウスでは BCG 感染後の持続的な IFN- γ および TNF- α の強い産生が認められ、菌の排除が亢進することが示された。これらの結果は、PD-1 シグナル経路の制御が結核菌に対する感染防御の発現を調節する上で重要な要素となり、その制御が適切な抗結核感染防御の発現を可能にするものと考えられる。

そこで本年度は、抗 PD-1 抗体を用いて PD-1 シグナル経路を阻害した場合の結核菌に対する防御免疫応答への影響、および BCG

ワクチン効果への影響について解析した。

B. 研究方法

結核菌感染実験

抗結核感染防御への抗 PD-1 抗体の効果を検査するため、C57BL/6 マウスに結核菌 (200 cfu) を経鼻感染させた。抗 PD-1 抗体 (100 μ g) またはコントロール抗体 (100 μ g) を感染 14、17 および 20 日後に静脈内投与し、その後のマウスの生存数を調べた。また、BCG (10⁴ cfu) 皮下免疫 4 週後のマウスに結核菌を経鼻感染させ、同様に抗 PD-1 抗体を投与し、その後のマウスの生存数を調べた。さらに、マウスを BCG で免疫し、14、17 および 20 日後に抗 PD-1 抗体 (100 μ g) を静脈内投与した。BCG 免疫 4 週後に結核菌を経鼻感染させ、その後のマウスの生存数を調べた。

菌数測定

結核菌感染 2 および 4 週間後に感染マウスより肺と脾臓を回収し、ホモジネートを作製した。段階希釈したホモジネートを Middlebrook 7H10 寒天培地に塗抹し、3 週間培養後にコロニー数を数え、臓器内生菌数を算出した。

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。

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

マウスに結核菌 (200 cfu) を経鼻感染させ、感染後 9 ヶ月経つと死亡するマウスが観察されるようになり、感染後約 1 年で全てのマウスは死亡した。結核菌感染後に抗 PD-1 抗体を投与したマウスでは、結核菌感染のみの群と比較して感染 4 週後の肺内生菌数が増加することが示された。また、肺