

2010. *Protein Expr. Purif.*, 69 :99–105.) に従い、HPLC を用いて測定した。また、それぞれの多量体形成についてはゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて確認を行った。

### 3. 阻害活性の測定

ドッキングシミュレーション解析の結果から Rv2613c に特異的な基質結合部位と相互作用を行うことが可能であると予想された化合物のうち、入手可能であった化合物をそれぞれ反応液中に添加して各酵素の活性測定を行った。活性測定は上記の方法に従った。通常の下で活性測定を行った結果をコントロールとして用いた。

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。実験を行う際には研究所内の安全講習を受講するとともに、実験計画について安全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

### 1. Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用することが予想される化合物の探索

前年度から引き続き、約 50 万種類の化合物について、ドッキングシミュレーション解析を行い、Rv2613c に特異的な基質結合部位との間に生じる相互作用エネルギーを計算した。エネルギー計算の結果から、Rv2613c の基質結合部位と相互作用を行うことが可能であると予想される約 40 種類の化合物を候補化合物として選択した。選んだ候補化合物は複数の環構造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。また、候補化合物の選択を行う段階で、毒物・劇物として指定されている化合物は除外した。

### 2. *M. avium*、並びに *M. smegmatis* 由来 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素の発現と精製

2 種類のカラムクロマトグラフィーにより SAD-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った *M. avium* 由来 MAV\_3489、並びに *M. smegmatis* 由来 MSMEG\_2932 の酵素活性を測定した結果、両者ともにリン酸存在下で Ap<sub>4</sub>A を基質として利用し、反応生成物として ADP と ATP が検出された。従って MAV\_3489、並びに MSMEG\_2932 は Rv2613c と同様に Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素であることが明らかにされた。また、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果から、MAV\_3489、並びに MSMEG\_2932 はともに溶液中で Rv2613c と同様の 4 量体を形成して活性を保持していることが示された。従って、MAV\_3489、並びに MSMEG\_2932 においても Rv2613c と同様に特徴的な 4 量体構造が基質結合部位の形成に関与していることが示唆された。

### 3. 阻害活性の測定

ドッキングシミュレーション解析の結果から、Rv2613c に特異的な基質結合部位と相互作用を行うことが可能であると予想された約 40 種類の化合物のうち入手可能であった 31 種類の化合物について、Rv2613c に対する阻害活性の測定を行った。その結果、4 種類の化合物 (化合物 No. 1、4、5、6) が反応液中に存在した場合には Rv2613c の活性がほとんど認められなくなったことから、この 4 種類の化合物は Rv2613c の活性を顕著に阻害していることが示された (Table 1)。また、他の 2 種類の化合物 (化合物 No. 2、3) が反応液中に存在した場合には Rv2613c の活性が約 50%程度にまで低下したことから、この 2 種類の化合物は Rv2613c の活性を約 50%阻害することが示唆された (Table 1)。

Rv2613c に対する阻害活性が認められた 6 種類の化合物について、抗酸菌由来 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素である MAV\_3489 と MSMEG\_2932、並びに *S. cerevisiae* 由来 Ap<sub>4</sub>A 加リン酸分解酵素である APA1 に対する阻害活性をそれぞれ測定した。その結果、

Rv2613c の活性を顕著に阻害した 4 種類の化合物のうち、2 種類の化合物 (化合物 No. 1、6) は MAV\_3489、MSMEG\_2932、及び APA1 の酵素活性も顕著に阻害した (Table 1)。一方、Rv2613c の活性を顕著に阻害した 4 種類の化合物のうち、残りの 2 種類の化合物 (化合物 No. 4、5) は、MAV\_3489、並びに MSMEG\_2932 の酵素活性も顕著に阻害したが、APA1 の活性はほとんど阻害しなかった (Table 1)。また、Rv2613c の活性を約 50% 程度阻害した 2 種類の化合物のうち、1 種類の化合物 (化合物 No. 2) は Rv2613c の活性のみを阻害し、残りの 1 種類の化合物 (化合物 No. 3) は MAV\_3489、並びに MSMEG\_2932 の酵素活性も 50% 程度阻害する一方、APA1 の活性はほとんど阻害しなかった (Table 1)。

#### D. 考察

結核菌由来 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と阻害活性測定の結果から、抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性のみを阻害し、*S. cerevisiae* 由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性はほとんど阻害しない 2 種類の化合物 (化合物 No. 4、5) を同定した (Table 1)。また、Rv2613c の活性のみを約 50% 阻害する化合物 (化合物 No. 2) と抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性のみを約 50% 阻害し、*S. cerevisiae* 由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性はほとんど阻害しない化合物 (化合物 No. 3) も同定した (Table 1)。本研究において、抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素である Rv2613c、MAV\_3489、及び MSMEG\_2932 は 4 量体構造を形成する一方、*S. cerevisiae* 由来 APA1 は単量体構造であることを明らかにし、さらに Rv2613c、MAV\_3489、及び MSMEG\_2932 は特徴的な 4 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を示した。従って、抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性のみを阻害する化合物は、ドッキングシミュレーション解析で予想された通り、抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素に特異的な基質結合

部位と相互作用を行うことによりその活性を阻害していることが示唆された。

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、本研究で同定した抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性のみを顕著に阻害する 2 種類の化合物は、結核菌や非結核性抗酸菌に対して特異的に殺菌活性を示す新規抗結核薬のリード化合物として有望であると考えられた。今後は、この 2 種類の化合物を用いて結核菌や非結核性抗酸菌に対する抗菌活性を測定するとともに、ヒト由来培養細胞系を利用した細胞毒性試験などを行うことにより、新規抗結核薬の開発に結びつくことが期待される。

#### E. 結論

ドッキングシミュレーション解析と阻害活性測定から Rv2613c の活性を阻害する化合物を 6 種類見出した。

抗酸菌由来  $Ap_4A$  加リン酸分解酵素の活性のみを顕著に阻害する化合物を 2 種類同定した。

この 2 種類の化合物は新規抗結核薬のリード化合物として有望である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

1) 森茂太郎、金玄、林原絵美子、柴山恵吾 . *Mycobacterium avium* 由来 MAV\_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG\_2932 の機能解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 仙台

#### 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

Table 1 阻害活性測定

\*コントロールの活性を 100%とした場合の活性。

名前	活性比 (%) *			
	Rv2613c	MAV_3489	MSMEG_2932	APA1
コントロール	100	100	100	100
No. 1	2	0	1	21
No. 2	47	100	100	100
No. 3	49	53	57	90
No. 4	0	17	4	85
No. 5	0	24	5	80
No. 6	0	0	0	0

平成24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）  
研究協力者 下袴田 陽子（国立療養所多磨全生園・医師  
国立感染症研究所・感染制御部・職員）

研究要旨

本研究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 CD4<sup>+</sup> T 細胞の CD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞(CTL)分化誘導における 'Help' 機能を明らかにすることで新規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 Peptide-25 が①選択的かつ強力に Th1 分化を誘導すること、②この分化には Peptide-25 刺激によって発現が誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていること、③Peptide-25 を介した 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グランザイム B の発現を伴う機能的 CTL 分化を誘導すること、④この樹状細胞の活性化には Peptide-25 刺激によって CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生される IL-17F が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本年度は Peptide-25 が誘導する Th1 分化への内在性 TAF7 の関与を確定させること、Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序及び IL-17F 産生細胞の分化形態を明らかにすることを目的とし解析を行なった。

その結果、①TAF7 が欠失した CD4<sup>+</sup> T 細胞では Th1 分化が顕著に抑制されること、②IL-17F 産生細胞は Th1 細胞、Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であること、③IFN- $\gamma$ 、T-bet 非依存的に IL-17F 産生細胞への分化が誘導されること、④IL-17F 産生細胞は感染局所での監視細胞であるレジデントメモリー様の分化形態を示すことが明らかになった。

以上の結果より、TAF7 は Th1 分化を調節する新たな転写調節因子であること、IL-17F 産生細胞は CTL 分化誘導に必須の新たなヘルパー T 細胞亜集団であるが示された。

A. 研究目的

結核ワクチンの目的は結核菌特異的獲得免疫を惹起し、メモリーCD8<sup>+</sup>細胞障害性 T 細胞(CTL)を効果的に誘導することである。

BCG は現在実用化されている唯一の結核ワクチンであるが、有効期間が短く、成人に対して効果的でないなどの問題がある。この問題を解決するためにはメモリーCTL を効率良く効果的に誘導するワクチンを開発する必要がある。メモリーCTL の分化は

ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞が最初に抗原を認識する時点で決定される。この決定には CD4<sup>+</sup> T 細胞の 'Help' が不可欠であると考えられているが、この 'Help' の本態に関しては未だ明らかではない。したがって、新たな結核ワクチンを開発するためには CD4<sup>+</sup> T 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。これまでに、①Ag85B のヘルパーエピトープを検索し、15 個のアミノ酸からなる Peptide-25(アミノ酸配列:FQDAYNAAGGHNAVF)が、I-A<sup>b</sup> 拘束性に選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できること、②Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③この T-bet 非依存性の Th1 分化には TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

さらに卵白アルブミン(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①Peptide-25 を介した 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グランザイム B の発現を伴う機能的 CTL 分化を誘導できること、②この樹状細胞の活性化には Peptide-25 刺激によって CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本年度は Peptide-25 が誘導する Th1 分化への内在性 TAF7 の関与を確定させること、Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序及び IL-17F 産生細胞の分化形態を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### (1)Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割の検討

BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Express システム(Life Technologies)よりデザインした TAF7 を標的とした miRNA(TAF7-miRNA)をレトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP(Cell Biolabs)に組み込み、PLAT-E 細胞(Cell Biolabs)を用いてレトロウイルス液を調製した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を DOTAP(Roche Applied Science)処理したレトロウイルス液存在下に Th null 条件下(抗

IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体添加)で固相化抗 CD3 抗体及び可溶性抗 CD28 抗体で刺激した。培養 5 日後に増殖した細胞を回収し、固相化抗 CD3 抗体で再刺激し、1 日後の GFP 陽性及び陰性細胞の IFN- $\gamma$  及び IL-4 産生を細胞内サイトカイン染色法にて検討し、Th 分化を評価した。

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

野生型樹状細胞または IFN- $\gamma$  欠損樹状細胞及び OVA 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞、IFN- $\gamma$  欠損 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 で刺激し、6 時間後及び 12 時間後の全細胞から RNeasy(Qiagen)を用いて mRNA を調製し、リアルタイム PCR 法にて *tgf- $\beta$ 1*、*tgf- $\beta$ 2*、*tgf- $\beta$ 3* 及び *il-6* mRNA の発現を検討した。さらに培養 1 日後の CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内染色法にて、CD4<sup>+</sup> T 細胞表面上の CD44 及び CD62L の発現をそれぞれの分子特異的抗体にて染色し検討した。

### (2) *in vitro* における CTL 分化誘導及び機能性の評価

野生型樹状細胞または IFN- $\gamma$  欠損樹状細胞及び OVA 存在下に P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞、IFN- $\gamma$  欠損 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 で刺激した。培養 1 日後に、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞、余剰の抗原を取り除いた 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 CTL への分化及び機能性を評価した。

## 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 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割の検討

Peptide-25 刺激した T-bet 欠損 P25

TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞においてもその頻度は低下するものの Th1 分化が誘導されること、この分化を調節する候補因子として同定された TAF7 をレンチウイルスベクターを用い T-bet 欠損 P25 TCR-Tg- CD4<sup>+</sup> T 細胞に強制発現させると *ifn- $\gamma$*  遺伝子のクロマチンリモデリングが誘導されることをこれまでに明らかにしてきた。そこで、TAF7-miRNA を T-bet 欠損 P25 TCR-Tg- CD4<sup>+</sup> T 細胞に導入することで TAF7 欠損-T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を作出し、内在性の TAF7 の機能を検討した。レトロウイルスベクターを用いて TAF7-miRNA を T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞に導入し、Th null 条件下(抗 IL-4 抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 IL-12 抗体を添加することでサイトカインによる分化が誘導されない条件となる)で Th 分化を誘導した。その結果、TAF7-miRNA が導入された細胞は野生型細胞及び mock-miRNA が導入された細胞に比べ Th1 分化の頻度が 1/4 以下に減弱し、一方 Th2 分化の頻度は 2 倍に増強した。

#### (2) Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化誘導機序の検討

ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞からグランザイム B の発現を伴う機能的 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、この樹状細胞の活性化には Peptide-25 刺激で CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生される IL-17F が必須であることをこれまでに明らかにしてきた。CD4<sup>+</sup> T 細胞亜集団において IL-17F は IL-17A と共に Th17 細胞が産生すると考えられている。この Th17 細胞への分化には TGF- $\beta$  と IL-6 の存在が不可欠である。そこで、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激し、6 時間後及び 12 時間後のこれらサイトカイン mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、*il-6* mRNA は Peptide-25 刺激 6 時間後、12 時間後いずれに時間においてもその発現が認められるのに対し、*tgf- $\beta$*  (1, 2, 3) mRNA はいずれの時間においても発現が全く誘導

されなかった。

IL-17F 産生細胞は IFN- $\gamma$  を産生しない。しかしながら IL-17F 産生細胞は Peptide-25 刺激で Th1 分化と共に誘導される。このことは IL-17F 産生細胞への分化が IFN- $\gamma$  存在下に誘導されていることを示している。そこで、IL-17F 産生細胞の分化誘導における IFN- $\gamma$  の関与を検討した。IFN- $\gamma$  欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を IFN- $\gamma$  欠損樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激し、1 日後の IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。その結果、IFN- $\gamma$  欠損細胞においても野生型とほぼ同程度に IL-17F 産生が誘導されることが明らかになった。さらにこの条件で活性化した IFN- $\gamma$  欠損樹状細胞の CTL 分化誘導能を検討した結果、野生型と同程度の機能的 CTL 分化が誘導された。また、Peptide-25 は T-bet 依存性の機構と TAF7 依存性の機構を活性化することで Th1 分化を誘導する。そこで、IL-17F 産生誘導及び IL-17F 産生細胞分化における T-bet の役割を T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて検討した。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 産生が誘導され、またこの条件下で活性化した樹状細胞は野生型樹状細胞と同程度の機能的 CTL 分化を誘導した。

#### (3) Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化形態の検討

Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞の分化形態を検討するために、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激した後の CD4<sup>+</sup> T 細胞表面の CD44 及び CD62L の発現を検討した。その結果、Th1 細胞は CD44 陽性 CD62L 弱陽性のエフェクターメモリー T 細胞様の形態を示すのに対し、IL-17F 産生細胞は CD44 強陽性 CD62L 弱陽性のレジデントエフェクター細胞様の形態を示すことが明らかになった。

#### D. 考察

遺伝子強制発現系を用いた解析から TAF7 はサイトカイン非依存性に *ifn- $\gamma$*  遺伝子の

クロマチンリモデリングを誘導する活性を有していることをこれまでに明らかにしてきた。しかしながら Peptide-25 刺激で発現誘導される内在性の TAF7 に Th1 分化誘導活性があるかについては確定できていない。そこで、TAF7-miRNA を用いて TAF7 欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞を作出し、内在性 TAF7 の Th1 分化における役割を検討した。その結果、TAF7 が欠失することによってサイトカイン非依存性の Th1 分化が顕著に減弱し、一方で Th2 分化は亢進した。この事実は TAF7 が CD4<sup>+</sup> T 細胞内で Th1 分化を調節する役割を担っていることを示している。また、T-bet は Th2 分化調節因子 GATA-3 の活性を阻害することで Th2 分化を抑制する作用を有していることが報告されている。TAF7 が欠失した条件下で Th2 分化が亢進するという事実は TAF7 が T-bet と同様に GATA3 の活性を阻害する活性を有している可能性を示唆している。また、Th1 分化を誘導する TAF7 及び T-bet の両方を欠失した CD4<sup>+</sup> T 細胞においても 1% 程度の頻度ではあるものの Th1 分化が誘導される。この 2 重欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞には STAT4 は Intact に存在することから、1% 程度の Th1 分化は STAT4 の活性化によって誘導されている可能性がある。したがって、Th1 誘導型 Peptide-25 はサイトカイン非依存性に TAF7、T-bet、STAT4 の発現・活性化を誘導することで、強力に Th1 分化を誘導する活性を有していることが示唆された。

IL-17F は IL-17 ファミリーに属し、活性化 T 細胞及び自然免疫担当細胞からホモダイマーまたは IL-17A とのヘテロダイマーとして分泌される。Peptide-25 刺激によって CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F には樹状細胞の活性化を誘導する活性があること、この IL-17F によって活性化した樹状細胞が機能的 CTL 分化誘導において重要な役割を果たしていることをこれまでに明らかにしてきた。IL-17A 及び IL-17F を産生する Th17 細胞への分化は IFN- $\gamma$  によって阻害されることが知られている。Peptide-25 刺激の場合、IFN- $\gamma$  共存下に IL-17F 産生が誘導されること、また IL-17A 産生は全く見られないこと、さらに Peptide-25 刺激条件下

では Th17 細胞の分化に必須の TGF- $\beta$  の産生が誘導されないこと、IL-17F 産生細胞は IFN- $\gamma$  を産生しないことから、Peptide-25 刺激で誘導される IL-17F 産生細胞は Th1 細胞、Th17 細胞とは異なる新たなヘルパー T 細胞亜集団であることが強く示唆された。

そこで、Peptide-25 刺激による IL-17F 産生細胞誘導機序に関して検討を加えた。Peptide-25 刺激は Th1 分化と共に IL-17F 産生細胞分化を誘導する。そこで、IL-17F 産生細胞の分化誘導における Th1 分化誘導因子及び細胞内分化調節因子の関与を検討した。その結果、Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$ 、Th1 分化を調節する細胞内転写因子 T-bet は IL-17F 産生及び IL-17F 産生細胞分化には必須ではないことが示された。我々は Peptide-25 による Th1 分化には TAF7 が重要な役割を果たしていることをこれまでに明らかにしている。今後 TAF7-miRNA を用いて IL-17F 産生細胞分化における TAF7 の関与を検討する予定である。

さらに IL-17F 産生細胞の分化形態を検討した結果、Peptide-25 で誘導される Th1 細胞がエフェクターメモリー細胞様の形態を示すのに対し、IL-17F 産生細胞はレジデントメモリー細胞様の形態を示すことが明らかになった。レジデントメモリー T 細胞は感染局所に留まり、再感染時に即時応答する細胞集団である。今後は論文に示されている CD8<sup>+</sup> レジデントメモリー T 細胞の特徴 (CD69 陽性、CD103 陽性) が CD4<sup>+</sup> IL-17F 産生細胞に認められるか検討していく予定である。

## E. 結論

本年度の研究から、① TAF7 が欠失した CD4<sup>+</sup> T 細胞では Th1 分化が顕著に抑制されること、② IL-17F 産生細胞は Th1 細胞及び Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であること、③ IL-17F 産生細胞への分化は IFN- $\gamma$ 、T-bet 非依存的に誘導されること、④ IL-17F 産生細胞は感染局所での監視細胞であるレジデントメモリー様の分化形態を示すことが明らかになった。

以上の結果より、TAF7 は Th1 分化を調節



する新たな転写調節因子であること、IL-17F 産生細胞は CTL 分化誘導に必須の新たなヘルパーT 細胞亜集団であるが示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 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・学術集会  
2012 年 6 月 札幌市

- 2) Shimohakamada, Y., T. Tamura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月 神戸市

#### 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

(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.

近年複数の化学療法薬の効果が見られない多剤耐性結核・超多剤耐性結核が増加しており国民の生命を脅かしている。我々は結核菌由来 micro RNA (miRNA) の発現が結核菌薬剤耐性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 を使用して定量的 PCR 法を開発した。次いでマウスの急性肺結核モデルにおける結核菌由来小型 RNA の解析、マウスの慢性持続感染再活性化モデルにおける菌由来小型 RNA の解析を行った。最後に薬剤耐性結核菌やアウトブレイク株における菌由来小型 RNA の解析を施行した。結核菌由来 miRNA は結核感染したマウス肺組織で発現しており、非感染肺では発現していなかった。慢性持続感染マウスモデルでは、再活性化が著しい個体で多くの発現が見られまた見かけの菌量がゼロとなった時点でも発現が認められた。以上の結果よりこれらの菌由来 miRNA を結核菌感染症のバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

結核菌の治療は数種類の化学療法薬を組み合わせる併用療法が主流であるが、その効果を消失させる多剤耐性結核や超多剤耐性結核は中央アジアや欧州で流行の兆しを見せている。多剤耐性結核や超多剤耐性結核の感染は急速に拡大しており、世界で毎年 50 万人程度が新たに感染。中央アジアと欧州の 50 カ国以上で毎年 10 万人以上が多剤耐性結核に感染すると言われている。その中で東欧と中央アジアでは感染率が高い。本邦においても 2002 年に 3122 株の結核菌について調査したところ、多剤耐性結核菌は 51 株 (1.6%) 超多剤耐性結核菌が 17 株 (0.5%) 検出されている。またかつては多剤耐性菌は感染力が弱くヒトからヒトへの感染はないとされていたが、結核療養所において一人の患者から 5 名に多剤耐性結核菌が感染した事例や多剤耐性結核の家族内集団発生も報告されておりヒトへの感染も無視できなくなってきた。これら多剤耐性結核や超多剤耐性結核を生じうる

臨床分離株を迅速に予測・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。

一方現在の化学療法薬に対する薬剤感受性検査は生菌を使用することから判定までの期間が最低でも数週間程度必要とされている。これは結核菌の増殖が一般細菌のそれと比較して極めて遅いことによる律速段階とされているが、薬剤感受性判定前に多剤耐性菌の感染が拡大する危険性があり、薬剤感受性検査のより迅速な方法が要望されている。

micro RNA (miRNA) は 18-25 ヌクレオチドの小型 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を行っていると考えられる。

miRNA は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。

一般細菌の研究から、小型の翻訳されない RNA が存在し、mRNA 制御に関与していることが知られている。加えて哺乳類の 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 も存在するが、それらを上流から制御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、結核菌の薬剤感受性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 は結核菌薬剤感受性のバイオマーカーの候補になる可能性がある。

本研究では昨年度当研究で開発した結核菌由来 miRNA 定量法を利用して以下のプロジェクトを施行した。(1) マウスの急性肺結核モデルにおける結核菌由来小型 RNA の解析、(2) マウスの慢性持続感染再活性化モデルにおける菌由来小型 RNA の解析、(3) 薬剤耐性結核菌やアウトブレイク株における菌由来小型 RNA の解析。

## 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' 側 linker を ligation した。再び電気泳動し、ゲル切除。5' 側 linker を ligation した。再び電気泳動し、ゲル切除。3' 側 RT primer を使用して逆転写。5' 側 primer と 3' 側 RT primer で PCR した、PCR 産物を TA cloning vector に ligation 後 cloning し、Sequence を行った。

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。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、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。

(1) マウスの急性肺結核モデルにおける結核菌由来小型 RNA の解析

5-10 週齢の BALB/c mice を用いて Glas-Col 社の inhalation system を使用して 200-500 colonies の H37Rv を噴霧感染させた。一か月後感染マウスの肺中の結核菌量は  $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^7$  個に達するがこの状態のマウスより抽出した肺ホモジネートより菌由来小型 RNA を抽出して定量的 PCR 解析を行った。コントロールとしては同週齢の非感染マウスを使用した。

(2) マウスの慢性持続感染再活性化モデルにおける菌由来小型 RNA の解析

慢性持続感染再活性化モデルとして、1956年 McCune らが発表し、Flynn らが 1999 年に再評価した Cornell model を使用した。これは結核菌噴霧感染一か月後の菌量が増加した状態に複数の化学療法薬 (INH と PZA) を使用して菌量を低下させ一旦 CFU を一万倍以上減少させた後にステロイドによって細胞性免疫を低下させ結核菌の再活性化を生じさせるモデルである。最近 Riley らが C57BL/6 mice ではなく BALB/c mice を使用することでステロイドを使用する必要がないことを発見したので、我々もこの方法に従った。見かけの菌量がゼロとなった治療終了時と菌量が確認された治療終了後 2 か月目に肺のホモジネートより菌由来小型 RNA を抽出して定量的 PCR 解析を行った。コントロールとしては (1) で使用した結核菌急性感染モデルの肺ホモジネートを使用した。

(3) 薬剤耐性結核菌やアウトブレイク株における菌由来小型 RNA の解析

抗化学療法薬として頻用されるイソニアジド、リファンピシン、エタンブトール、ストレプトマイシン、レボフロキサシンの

単剤耐性 (<sup>r</sup>INH, <sup>r</sup>RFP, <sup>r</sup>EB, <sup>r</sup>SM, <sup>r</sup>LVFX) の臨床分離株とイソニアジドとリファンピシン両方に耐性である多剤耐性菌 (<sup>r</sup>INH+<sup>r</sup>RFP) より菌由来小型 RNA を抽出して定量的 PCR 解析を行った。コントロールとして薬剤感受性結核菌の定量的 PCR 解析を行った。また同様の解析をアウトブレイクを起こした結核菌株で施行して、菌由来小型 RNA がバイオマーカーとして使用できる可能性を検討した。

### C. 研究結果

(1) マウスの急性肺結核モデルにおける結核菌由来小型 RNA の解析

結核菌噴霧感染実験では感染肺のみ菌由来小型 RNA が認められた。

一方非感染肺では菌由来小型 RNA は認められなかった(図 1)。また菌由来小型 RNA は菌量の多い肺組織でより多くの発現が認められた。

(2) マウスの慢性持続感染再活性化モデルにおける菌由来小型 RNA の解析

慢性持続感染から再活性化が激しい肺組織において、より多くの菌由来小型 RNA が発現していた。

また見かけの菌量がゼロとなる時期においても肺組織中で、量は少ないながらも菌由来小型 RNA は発現していた。

(3) 薬剤耐性結核菌やアウトブレイク株における菌由来小型 RNA の解析

INH、SM、LVFX 耐性株は耐性機序は異なるものとされているが、同程度の菌由来小型 RNA の発現が見られた。

RFP、EB 耐性株も耐性機序は異なるものとされているが、同程度の菌由来 miRNA の発現が見られた。

薬剤感受性株、RFP、EB 耐性株は、INH、SM、LVFX 耐性株と比較して 100-1000 倍の miRNA 発現が見られた(図 2)。アウトブレイクを起こした臨床分離株を使用して菌由来小型 RNA を定量した結果は、それ以外の臨床分離株とは異なる定量パターンを示した。

### 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 を利用して以下のプロジェクトを行った。

(1) マウスの急性肺結核モデルにおける結核菌由来小型 RNA の解析

(2) マウスの慢性持続感染再活性化モデルにおける菌由来小型 RNA の解析

(3) 薬剤耐性結核菌やアウトブレイク株における菌由来小型 RNA の解析

(1) においては感染肺でのみ菌由来小型 RNA が認められ、非感染肺では認められなかったことから、このアッセイ系が宿主の小型 RNA を測定せず菌由来の小型 RNA のみを測定する系として有効であることが示唆された。(2) においては、化学療法を行った直後の見かけの菌量がゼロの時も菌由来小型 RNA の発現が認められ、慢性持続感染時においても、結核菌の持続的な増殖が確認された。(3) においては特に INH、SM、LVFX 耐性株は薬剤耐性機序が異なるにもかかわらず、同程度の菌由来小型 RNA の発現が見られており、薬剤耐性を惹起する遺伝子の上流を菌由来小型 RNA が制御している可能性が示された。またアウトブレイクを起こした臨床分離株を使用して菌由来小型 RNA を定量した結果は、それ以外の臨床分離株とは異なる定量パターンを示したことから、このアッセイによってアウトブレイクを前もって予測できる可能性が示唆された。

### E. 結論

結核菌由来小型 RNA は噴霧感染したマウス肺組織で発現しており、非感染肺では発現していなかった。慢性持続感染マウスモデルでは、再活性化が激しい個体で多くの発現が見られ、結核菌由来小型 RNA がバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。慢性持続感染時の見かけの菌量がゼロの際も発現が見られ結核菌が慢性持続感染時にも活動していることが示唆された。活動性結核患者末梢血から抽出した RNA からは菌由来小型 RNA が検出されなかった INH、SM、LVFX 単剤耐性結核菌由来の小型 RNA は感受性株より発現が低かった。RFP、

EB 単耐性結核菌や INH, RFP 耐性多剤耐性結核菌では感受性株同様の発現であった。またアウトブレイク株では発現は感受性株と一部相違が見られた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2012. *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.*, 39: 389-396.
- 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2012. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 275-278.
- 3) Yotsu, R., N. Nakanaga, Y. Hoshino, K. Suzuki, and N. Ishii. 2012. Buruli Ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous mycobacterium infection. *J. Dermatol.*, 39: 587-593.
- 4) Kamijo, F., H. Uhara, H. Kubo, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, and R. Okuyama. 2012. A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a

review of cutaneous infection. *Case Rep. Dermatol.*, 4: 76-79.

- 5) Hamamoto, T., A. Yuki, K. Naoi, S. Kawakami, Y. Banba, T. Yamamura, R. Hikota, J. Watanabe, F. Kimura, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, H. Shimazaki, K. Nakanishi, and S. Tamai. 2012. Bacteremia due to *Mycobacterium massiliense* in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74: 183-185.
- 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. *J. dermatol.*, 40: 1-9.

##### 2. 学会発表

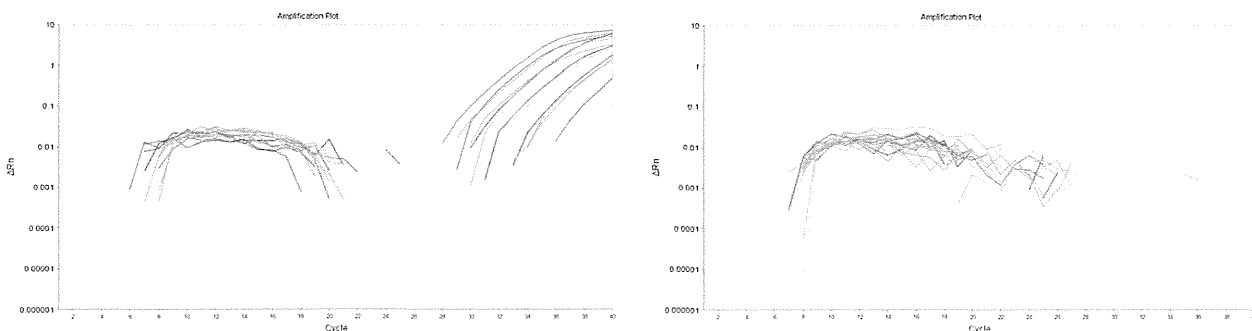
- 1) Yoshihiko Hoshino. Receptor of trehalose di-mycolate (TDM), mincle (macrophage inducible C-type lectine) determines the susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* EMBO conference serie "Tuberculosis 2012". September 10-18, 2012, Paris, France.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

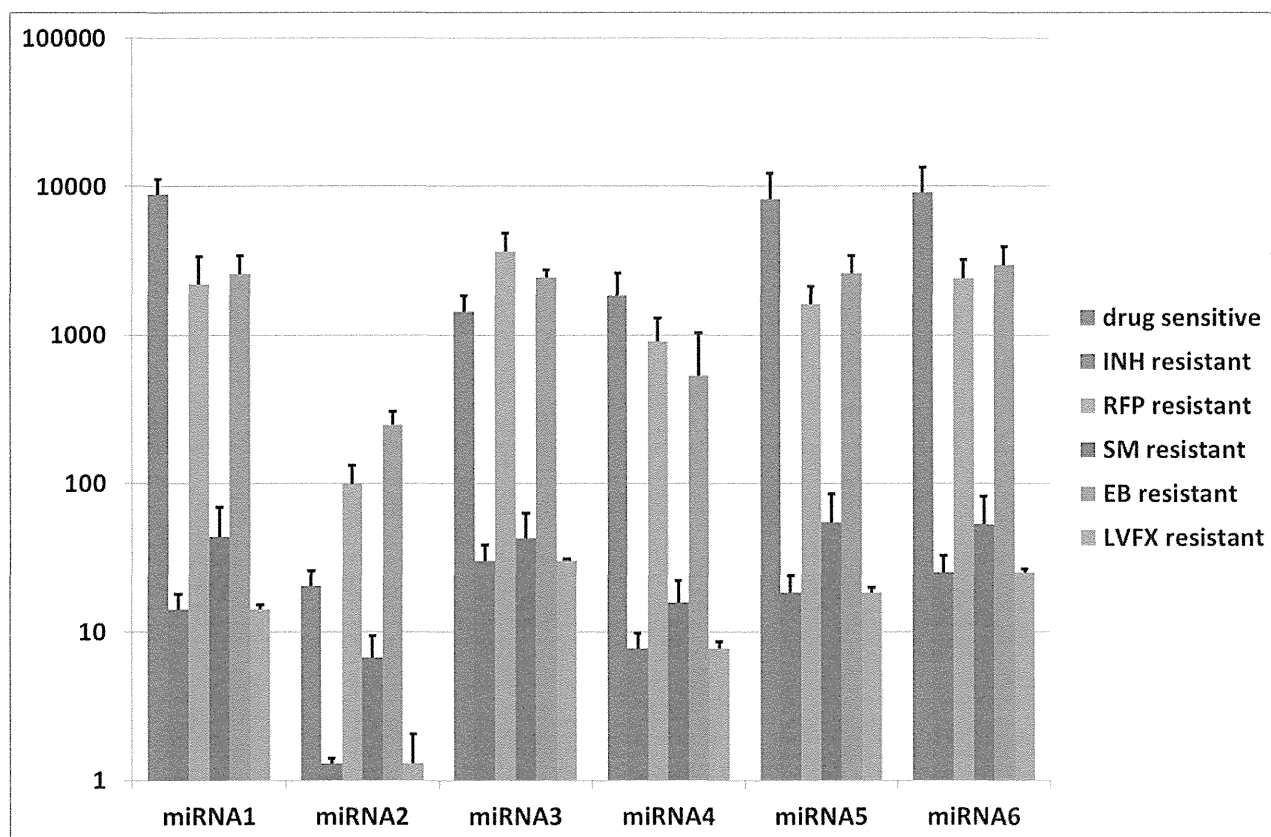
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

結核菌を噴霧感染させたマウス由来の肺ホモジネート

結核菌未感染マウス由来の肺ホモジネート



(図1) 結核菌噴霧感染マウスと未感染マウスの肺ホモジネートを使用した菌由来小型 RNA 定量



(図2) 薬剤耐性結核菌を使用した菌由来小型 RNA 定量 H37Rv の 16S rRNA をコントロールとして使用した。

平成24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（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。AIM2 欠損マウスは、結核菌に対する感受性が高くなるが、その分子機構として、細胞質内に逃れた病原性結核菌の DNA 認識し、インフラマゾームの活性化、そして IL-1beta, IL-18 の分泌を誘導することにより、結核菌感染防御を担っていることが明らかになった。また、ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 の欠損マウスが、結核感染に対する感受性が高いことが明らかになった。

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 ファミリー、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

これまでに、GBP ファミリー欠損マウス、AIM2 欠損マウスを作製し、結核感染における役割を解析した。GBP ファミリー欠損マウスは、細胞内寄生性原虫トキソプラズマの感染に対する感受性が高くなるものの、

結核感染に対する感受性には変化がなかった。このように、GBP ファミリー分子は、同じ細胞内寄生性病原体において、異なる機能を有することを明らかにした。

また、Absent in Melanoma 2 (AIM2) 欠損マウスを作製し、結核感染における役割を解析した。AIM2 は、細胞内 DNA センサーとして同定された分子で、ウイルス感染における重要性が明らかにされていた。AIM2 欠損マウスは、結核感染に対する感受性が高くなっていることが明らかになった。また、AIM2 欠損マウスでは、結核感染後の IL-1beta, IL-18 の産生が著明に低下し、Th1 応答も低下していることを見出していた。

今年度は、そのメカニズムをさらに解析した。IL-1beta, IL-18 はインフラマゾームの活性化により caspase-1 依存性に分泌されることが知られている。そこで、正常マウスおよび AIM2 欠損マウスより腹腔マクロファージを単離し、結核菌を感染させ、18 時間後に caspase-1 の発現を解析した。また、正常マウスおよび AIM2 欠損マウス由来の腹腔マクロファージに結核菌ゲノム DNA をリポフェクトアミンで細胞質内に導入し、反応性 (IL-1beta, IL-18 産生、caspase-1 の発現) を解析した。結核菌 DNA

を Hoechst 33342 で蛍光ラベルし、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に感染させ、24 時間後に貪食胞を染色する抗 Rab7 抗体で免疫染色し、病原性結核菌のマクロファージ内での局在を解析した。さらに、結核菌 DNA と AIM2 の局在を解析するため、結核菌 DNA を Hoechst 33342 で蛍光ラベルし、RAW264.7 に感染させ、貪食胞を認識する LAMP1 に対する抗体、および、AIM2 に対する抗体で染色した。

さらに、ヒアルロン酸合成酵素 HAS1, HAS3 の遺伝子欠損マウスを作製し、結核菌を経気道的に感染させ、感受性を解析した。

#### 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

AIM2 欠損マウス由来の腹腔マクロファージは、結核菌感染による caspase-1 (p10) の発現が誘導されなかった。また、結核菌ゲノム DNA 刺激による IL-1beta, IL-18 分泌が認められなかった。また caspase-1 (p10) の発現も誘導されなかった。結核菌 DNA を Hoechst 33342 で蛍光ラベルし、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に感染させ、貪食胞を認識する抗 Rab7 抗体で免疫染色すると、貪食胞とマージする結核菌だけでなく、マージしない結核菌が認められた。

HAS3 欠損マウスは、結核感染に対する感受性が正常マウスとの間に有意な差を認めなかった。一方、HAS1 欠損マウスでは、結核感染 4 週間後の肺での結核菌数が有意に多くなっていた。

#### D. 考察

AIM2 欠損マウスでは、結核菌ゲノム DNA 依存性のインフラマゾーム活性化が障害さ

れ、IL-1beta, IL-18 の産生が低下していることが示された。さらに、病原性結核菌は、マクロファージの貪食胞から逃れ、一部は細胞質内に存在した。さらに、細胞質内に逃れた結核菌の DNA に AIM2 が会合することが示唆された。

HAS1 欠損マウスに、結核菌を経気道感染させ、4 週間後に肺の結核菌数を測定すると、HAS1 欠損マウスにおいて、結核菌数が増加していた。

#### E. 結論

AIM2 は、細胞質内に逃れた病原性結核菌の DNA 認識し、インフラマゾームの活性化、そして IL-1beta, IL-18 の分泌を誘導することにより、結核菌感染防御を担っていることが明らかになった。

また、ヒアルロン酸合成酵素 HAS1 が結核感染防御に重要な役割を担っていることが明らかになった。今後、HAS1 による結核感染防御機構を明らかにしていきたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N. Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2012. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. Immunol.*, 24: 637-644.

##### 2. 学会発表

- 1) Kiyoshi Takeda. Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention. 5<sup>th</sup> India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bagalore, India.
- 2) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The 4<sup>th</sup> AsiaHORCs Joint Symposium, November 11-14, 2012, Buyeo, Korea.
- 3) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity.

International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo.

- 4) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 34<sup>th</sup> Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan.
- 5) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 7<sup>th</sup> RCAI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama.
- 6) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo.
- 7) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo.

- 8) 竹田潔. 腸管免疫と炎症制御. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2012年7月 福岡
- 9) 竹田潔. プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構. 第12回日本抗加齢医学会総会 2012年6月 横浜
- 10) 竹田潔. 自然免疫と消化管疾患. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年5月 大阪
- 11) 竹田潔. 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御. 第49回日本臨床分子医学会学術総会 2012年4月 京都

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

(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)