

201225007B

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

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

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

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

平成22年度～平成24年度 総合研究報告書

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

総合研究報告書

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

牧野 正彦（国立感染症研究所） 1

研究成果の刊行に関する一覧表 29

平成22年度～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)

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

総合研究報告書

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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

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.

本研究班においては、結核に対する新しい治療法および予防法の開発を中心に研究を展開した。自然免疫応答に関わるもの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ノックアウトマウスを作製し解析した。GBPファミリーは、同じ細胞内寄生性病原体のトキソプラズマ原虫に対する生体防御に重要な役割を果たすものの、結核感染防御においては、重要な役割を担っていないことが明らかになった。細胞内 DNA センサーの Absent in Melanoma (AIM)2 は、細胞質内に逃れた病原性結核菌の DNA を認識し、インフラマゾームの活性化、そして IL-1 β 、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。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から、HAS1 が結核感染防御に重要な役割を担っていることが示唆された。

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。結核菌および BCG に対する感染防御の発現誘導における PD-1 経路の関与を検討した。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、肺において著しい菌数の増加が認められた。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性細胞の著明な浸潤、および壊死を伴う広範な炎症性病変が観察された。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、PD-1 欠損マウスでは抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の過剰な IFN- γ 産生応答が致命的な炎症反応を惹起することが判明した。一方、BCG 感染では結核菌感染で見られた激しい炎症反応は誘導されず、感染 3 週間後には強い防御免疫が誘導された。しかし、BCG 感染後に PD-1 シグナル経路の活性化が誘導されると、抗原特異的 T 細胞機能が抑制され、それ以降の菌の排除が阻害されることが示された。この結果から、PD-1 シグナル経路を適切に制御することで、結核に対する *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) ワクチン効果を亢進させうる可能性が示された。そこで、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 BCG ワクチン効果への影響について検討した。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減少と炎症性サイトカインやケモカイン産生量の低下が認められた。また、結核菌感染後 13 ヶ月経過した時点でのマウスの生存率は 60%で、結核菌感染に対する BCG ワクチン効果は認められたが、17 ヶ月後

には生存率は20%まで低下した。一方、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免疫のみの群と比較するとサイトカインおよびケモカイン産生は同程度であったが、結核菌感染17ヶ月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ことが示された。結核に対するワクチンとして弱毒化牛型結核菌BCGが使われてきたが、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。一方、同じ抗酸菌に分類されるらい菌の感染により発症するハンセン病においても、BCG菌の有効性は26%にとどまると報告されている。これまでに、ハンセン病の発症を抑制するワクチンとして改良型BCGの作製に成功している。改良型BCGにおいては、らい菌の主要抗原としてMajor Membrane Protein (MMP)-IIを同定し、BCGに対してMMP-II単独あるいはHSP70-MMP-II連結遺伝子を組み込ませる方策が有効であることを報告してきた。MMP-IIは結核菌にも存在するため、同様に作製したBCGが結核菌に対しても有効に作用する可能性が示唆される。しかし、らい菌のMMP-IIと結核菌のMMP-IIとは、アミノ酸レベルでの相同性は90%にとどまり、結核菌のMMP-IIの抗原性、特に獲得免疫応答惹起能については報告されていない。そこで、結核菌由来MMP-II及びHSP70-MMP-II融合蛋白の抗原提示細胞及びCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞の活性化能を評価した。ヒト単球由来樹状細胞を活性化IL-12の産生を誘導するとともに、樹状細胞を介しヒトナイーブCD4陽性及びCD8陽性T細胞を活性化しインターフェロンガンマ(IFN- γ)の産生を誘導した。その程度は、らい菌由来MMP-IIよりも強かった。さらに、MMP-IIとHSP70-MMP-II融合蛋白を比較すると、後者においてより強くT細胞を活性化した。さらに、結核菌感染樹状細胞及びマクロファージは、細胞表面にMMP-II抗原を発現したことより、結核菌由来MMP-IIは抗原性に富んだワクチン候補分子であることが判明した。次いで、ウレアーゼ欠損BCGにHSP70-結核菌由来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。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。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。さらに、これまでのBCG改良戦略に基づき、ウレアーゼ欠損リコンビナントBCGにHSP70、活動期結核菌に発現するCys0及びMMP-II遺伝子を連結した遺伝子を導入し、新しいリコンビナントBCG、BCG-dHCMを産生した。BCG-dHCMは菌体外へHSP70-Cys0-MMP-II融合蛋白を分泌し、またBCG-dHCMをパルスした樹状細胞はヒト未感作CD4陽性T細胞及び未感作CD8陽性T細胞を活性化して大量のIFN- γ を産生した。未感作CD8陽性T細胞はTAP及びプロテオゾームに依存したcytosolic cross-presentation経路により活性化されていた。さらに、未感作T細胞の活性化はファゴゾームの成熟化が密接に関与していた。C57BL/6マウスにBCG-dHCMを接種すると長期生存可能で、HSP70・Cys0・MMP-IIさらには結核菌の細胞質蛋白による二次刺激に強く反応するメモリータイプのT細胞をポリクローナルに、かつ効率的に産生した。したがって、ウレアーゼを欠損したリコンビ

ナント BCG に結核菌由来の免疫原性蛋白及び病原性をコードする蛋白の遺伝子を導入することが、従来の BCG より有効に作用する BCG ワクチンを作成する上で有効と考えられた。

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⁺細胞障害性 T 細胞 (CTL) が実効細胞であることから、結核ワクチンにおいてはメモリー CTL の分化を効果的に誘導することが目的となる。メモリー CTL への分化には CD4⁺ T 細胞の存在が不可欠であるが、CD4⁺ T 細胞の 'Help' 機序に関しては未だ明らかではない。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 分化誘導機構を解明し、このペプチドによって分化・活性化する CD4⁺ T 細胞の 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。本研究によって Peptide-25 は①サイトカイン非依存的に *ifn-γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを誘導する転写因子 TAF7 (TATA box binding protein associated factor) 及び T-bet の発現を誘導し、さらに IL-12 受容体 β2 鎖の発現を誘導する STAT4 の活性化を誘導することで強力かつ選択的に Th1 分化を誘導する活性を有していること、②Th1 分化誘導環境下で CD4⁺ T 細胞から IL-17F 産生を誘導することで樹状細胞を活性化し、その樹状細胞が機能的 CTL 分化を誘導すること、④この 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を明らかにし、IL-17F がワクチン効果を増強できる可能性のある因子であることを示した。

多剤耐性結核菌や非結核性抗酸菌に有効で、新しい作用機序を持つ新規抗結核薬の開発が急務となっている。そこで、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た。新規抗結核薬の標的として結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) 加リン酸分解酵素である Rv2613c を選び研究を進めた。Rv2613c の立体構造を決定し、詳細な機能構造相関解析を行った。その結果、Rv2613c の活性中心部位の構造はヒト由来 diadenosine polyphosphate 加水分解酵素の構造と類似している一方で、Rv2613c の基質結合部位は 4 量体構造と Trp 残基を利用した特異的な構造であることを明らかにした。また、Rv2613c の基質特異性に関与しているループ構造も見いだした。Rv2613c の立体構造情報を基にしたドッキングシミュレーション解析により、Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことによってその活性を阻害する化合物を探索した結果、約 40 種類の化合物が候補として選ばれた。候補化合物を用いて Rv2613c に対する阻害活性の測定を行った結果、4 種類の化合物が Rv2613c の活性を顕著に阻害し、2 種類の化合物が Rv2613c の活性を約 50% 阻害することが示された。さらに、Rv2613c の活性を顕著に阻害した 4 種類の化合物うち 2 種類の化合物は、Rv2613c 以外の抗酸菌由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素の活性も顕著に阻害する一方で、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素の活性はほとんど阻害しないことが示された。この 2 種類の化合物は結核菌や非結核性抗酸菌に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。

研究分担者

柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
田村 敏生	(国立感染症研究所・感染制御部・室長)
星野 仁彦	(国立感染症研究所・感染制御部・室長)
竹田 潔	(大阪大学大学院医学研究科・免疫制御学・教授)
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)

A. 研究目的

結核菌由来 miRNA の挙動で、結核菌の薬剤感受性が予想し得るか検討することを目的とした。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感染早期治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。

結核菌は感染しても多くの場合結核を発症せず、そのまま長期間に渡り体内で生存し続ける。宿主の抵抗性が低下すると感染した菌が増殖し、結核を発症する。一方、結核菌が感染した宿主では、感染数週間後には抗原特異的 Th1 型 T 細胞が誘導され、防御免疫が発現する。しかし、防御免疫が発現しても菌の増殖を抑えることはできるが、菌を体内から排除することはできない。結核を撲滅するためにはこの結核菌が有する宿主防御免疫に抵抗するメカニズムを明らかにすることが必要であり、そこから得られた知見は必ず新たな治療法や予防法の開発に有益な情報となる。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 ファミリーに属する分子は 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 との結合を介して 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。本研究では、細菌性慢性感染を引き起こす結核菌および BCG のマウス感染モデルを用いて、感染後に誘導される免疫応答の制御に PD-1 シグナル経路が関与するか否かについて解析を行った。

結核・ハンセン病など病原性抗酸菌感染症に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を中心とした獲得免疫応答により営まれており、これら T 細胞を活性化する抗原提示細胞としては樹状細胞が重要な働きを果たしている。これらの病原性抗酸菌感染症を予防するワクチンとして BCG が使われてきたが、その有効性は極めて限られていて、新たなワクチンの開発が切望されている。全世界的にも最重要研究課題の一つとして位置付けられている。ワクチン開発に当たっては様々な試みがなされてきたが未だに有効性は確立されていない。これまでに、ハンセン病に対するワクチン開発を展開してきたが、らい菌の主要抗原として MMP-II を見出し、MMP-II は CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を有し、さらに、TLR2 に結合することから、ファゴゾームの内膜や細胞表面に発現した TLR2 を刺激し、宿主細胞の NF- κ B を活性化し、その結果樹状細胞を活性化することが可能であった。

また、MMP-II 遺伝子に結核菌由来の分泌シグナルあるいは BCG 菌由来の HSP70 遺伝子を連結して BCG に組み込んでリコンビナント BCG を作製すると、親 BCG に比し有意に強くらい菌の生体内での増殖を抑制することが可能であった。結核菌の増殖も同様な方策で抑制できる可能性があると考えられるが、結核菌由来の MMP-II については、未知であって、T 細胞活性化能も検討されていない。そこで、結核菌由来の MMP-II 及び本 MMP-II を用いた HSP70-MMP-II 融合蛋白について、らい菌由来のこれらについて比較しつつ、結核菌由来の MMP-II の抗原性について検討を加えることを目的の一つとした。BCG は、本質的にナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化し、タイプ 1 サイトカインを産生するが、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化することはできない。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周到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、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、ファゴゾームの酸性化を促進してライソゾームとの融合を容易にした。第 2 の方法は、BCG から積極的に病原性抗酸菌の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出することであった。これまでに主要抗原として MMP-II を使い、さらに、シャベロン効果を有しアジュバント活性を持つ HSP70 を併用した。すなわち、HSP70 遺伝子と MMP-II 遺伝子を融合させ、これを BCG に遺伝子導入した。二つの方策は何れも有効であった。さらに両方法を組み合わせ、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG である 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、さらに増強した。そこで、結核用ワクチンの開発を目的として、*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)、さらには HSP70-結核菌由来の CysO と MMP-II の 3 者を連結した遺伝子を導入したリコンビナント BCG (BCG-dHCM) 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。

BCG は、有効期間が短く成人に対する有効性が低い。メモリー CTL を効率良く効果的に誘導する新たなワクチンを開発する必要がある。メモリー CTL への分化はナイーブ CD8⁺ 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 CD4⁺ T 細胞の存在が不可欠である。しかし、CD4⁺ T 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。結核菌の分泌蛋白である Ag85B は強い免疫原性を有し、強力に Th1 分化を誘導する。これまでに、Ag85B のヘルパーエピトープを検索し、Peptide-25 が I-A^b 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、Peptide-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、T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、この T-bet 非依存的な Th1 分化には TAF7 が関与している可能性を示してきた。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 Peptide-25 を介した CD4⁺ 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を明らかにしてきた。そこで、Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導機序及び機能的 CTL の分化を誘導する Peptide-25 を介した CD4⁺ T 細胞と樹状細胞間相互作用を司る因子を解明することを目的とした。

多剤耐性結核菌や非結核性抗酸菌に有効な治療薬がほとんど存在しないことから、新たな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類縁化合物であることから、まったく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、結核菌の生理機能に重要なタンパク質を新規抗結核薬の標的候補として選び、その機能を特異的に阻害する化合物をデザインすることによって、新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的としている。結核菌由来の機能未知タンパク質である Rv2613c をコードする遺伝子を破壊した株では生育能が低下することや、*in silico* 解析から Rv2613c が新規抗結核薬の標的候補の 1 つとして考えられることが報告されていることから、Rv2613c を新規抗結核薬の標的候補として選び、その酵素機能の解析を行ってきた。その結果、Rv2613c は一次構造上の特徴が diadenosine polyphosphate 加水分解酵素と類似しているにもかかわらず、Rv2613c は基質である diadenosine tetraphosphate (Ap_4A) に対して加リン酸分解活性を示すことを明らかにした。また Rv2613c は他の diadenosine polyphosphate を基質とする酵素とは異なり、溶液中で 4 量体を形成していることも示した。このように、Rv2613c の一次構造上の特徴と酵素活性の関連性が既知の酵素とは異なること、並びに Rv2613c が特徴的な 4 量体構造を示すことから、Rv2613c の活性中心もしくは基質結合部位の構造が他の類似酵素とは異なっていることが予想され、Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物のデザインが可能であると考えられた。そこで、Rv2613c の立体構造を決定し、Rv2613c の機能と構造の相関解析を行うことによって、Rv2613c の活性中心部位や基質結合部位の詳細な構造を明らかにした。さらに、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 の

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る化合物の選定を行うとともに、選ばれた化合物のうち Rv2613c に対して阻害活性を示す化合物の同定を行った。これらの研究を通じて、結核菌や非結核性抗酸菌に特異的に殺菌活性を示す新規抗結核薬のリード化合物を同定することを目的とした。

B. 研究方法

結核菌由来 miRNA について、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。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。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。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。薬剤耐性結核菌における菌由来 miRNA の解析として、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の臨床分離株とイソニアジドとリファンピシン両者に耐性である多剤耐性菌 ($rINH^+RFP$) より菌由来 miRNA 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。

結核菌の経気道的感染により、TLR 依存性に感染早期に肺胞腔に肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージから分泌されるリポカリン 2、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) の機能を解析し、それぞれ鉄イオンの取り込み抑制、細胞膜透過性亢進により結核菌の増殖を抑制しているこ

と、個体レベルでも結核菌感染に重要な役割を担っていることを遺伝子欠損マウスの解析により明らかにしてきた。そこで、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を作製し解析する。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- γ 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、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 ES 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 ES 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 ES 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、C57BL/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、クロモソーム 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。細胞内 DNA センサーとして同定された 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。また、AIM2 欠損マウスが結核感染に対する感受性が高くなるメカニズムをさらに解析する。IL-1 β , IL-18 はインフラマソ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 の発現を解析する。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-1 β , IL-18 産生、caspase-1 の発現) を解析する。結核菌 DNA を蛍光ラベルし、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する。さらに、結核菌 DNA と AIM2 の局在を解析するため、結核菌 DNA を蛍光ラベルし、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) が肺では発現が炎症時に誘導される知られている。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。

結核菌感染実験については、正常 C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させ、その後のマウス生存率を調べた。さらに、感染後経時的に肺および脾臓をホモジナイズし、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検討した。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。抗体を用いた IFN- γ 中和実験として、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 週後に抗 IFN- γ 抗体を静脈内注射し、その後のマウスの生存率を観察した。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。抗 PD-1 抗体併用による BCG ワクチン効果の解析として、マウスを BCG 皮下免疫し、その 4 週後に結核菌を経鼻感染させた。結核菌感染 14、17 および 20 日後に抗 PD-1 抗体を投与し、その後のマウスの生存率を調べた。さらに、マウスを BCG で免疫し、その 14、17 および 20 日後に抗 PD-1 抗体を静脈内投与した。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率を調べた。

Mycobacterium smegmatis に結核菌由来 MMP-II 遺伝子あるいは HSP70-MMP-II 遺伝子を導入し、リコンビナント蛋白を作製した。正常健常人末梢血より、単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、rGM-CSF および rIL-4 を添加して、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、精製蛋白をパルスし、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに培養することで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、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と混合培養し、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。樹状細胞から産生される各種サイトカインも同様に測定した。抗原添加樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。

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 rBCG (BCG-DHTM) を作製した。さらに同様にして、BCG-dHCM を作製した。正常健常人末梢血より得た樹状細胞に対して、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、上記と同様に行った。rBCG 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を 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、リコンビナント rBCG 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 rBCG 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。

Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における TAF7 の役割の検討は以下の通り行った。I-A^b 分子を遺伝子導入した I-A^b-CHO を抗原提示細胞とし、Peptide-25 で刺激した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞より得た cDNA より PCR 法を用いて TAF7 をクローニングし、レンチウイルス発現ベクター CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus に組み込み、293FT 細胞を用いてレンチウイルス液を調製した。レトロネクチン固相化プレートを用いてレンチウイルス結合プレートを作成し、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を添加し、CD4⁺ T 細胞にレンチウイルスを感染させた。レンチウイルス感染 T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Th null 条件下にて抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、Venus 陽性細胞を分取し、抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行ない *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを評価した。また、BLOCK-iTTM RNAi Express システムよりデザインした TAF7 を標的とした miRNA をレトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP に組み込み、PLAT-E 細胞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⁺ T 細胞を DOTAP 処理したレトロウイルス液存在下に Th null 条件下にて固相化抗 CD3 抗体+可溶性抗 CD28 抗体で刺激し、増殖した細胞を回収し、固相化抗 CD3 抗体で再刺激した。再刺激 1 日後の GFP 陽性及び陰性細胞の IFN- γ 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。Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導における STAT4 の役割の検討については、STAT4 の活性化はチロシン残基のリン酸化は指標に評価した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、PE 標識抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体を用いて STAT4 のチロシンリン酸化を評価した。また、STAT4 の活性化及び IL-12R β 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⁺ T 細胞をチロシンリン酸化酵素阻害剤である HerbimycinA と共培養した後、I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、刺激後の IL-12R β 2 鎖及び活性化 STAT4 の発現量を評価した。CD8⁺ T 細胞の機能的分化に必須の樹状細胞の活性化を誘導する CD4⁺ T 細胞と樹状細胞の相互作用を司る因子の検討として、樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 または TCR に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A で刺激し、mRNA を調製し、3D-Gene を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。3D-Gene 解析にて絞り込まれた候補遺伝子の P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞における Peptide-25 または APL 刺激後の経時的発現変化を Real-Time PCR 法にて確認した。Real-Time PCR 法にて Peptide-25 刺激でのみ CD4⁺ T 細胞に発現が誘導されることを確認できた候補因子の蛋白レベルでの発現様式は ELISA 法、FACS 法にて確認した。*in vitro* における CTL 分化誘導及び機能性の評価として、野生型樹状細胞または IFN- γ 欠損樹状細胞及び OVA 存在下に P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞、IFN- γ 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激した。必要に応じて、抗

IL-17F 中和抗体または rIL-17F を添加した。OT-1-CD8⁺ 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。Peptide-25 刺激による CD4⁺ T 細胞からの IL-17F 産生誘導機序及び分化形態の検討として、野生型または IFN- γ 欠損樹状細胞または I-A^b-CHO 及び OVA 存在下に各種 CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激し、全細胞から mRNA を調製し、リアルタイム PCR 法にて *tgf- β 1*, *tgf- β 2*, *tgf- β 3* 及び *il-6* mRNA の発現を検討した。CD4⁺ T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内染色法にて、CD4⁺ 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。

結核菌由来 Rv2613c の立体構造は、Met 残基をセレノメチオニンに置換した変異体の結晶を用いた単波長異常分散法によって決定した。立体構造の比較は Dali Lite を用いて行い、比較対象の立体構造は Protein Data Bank より入手した。Rv2613c のアミノ酸残基を置換、もしくは削除した変異体は、QuickChange II キットを用いて作製した。Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことによってその活性を阻害する化合物の探索は、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により行った。ドッキングシミュレーション解析には、統合計算化学システム並びに分子シミュレーションシステムを用いた。ドッキングシミュレーション解析に使用した化合物データベースは、LigandBox データベースから入手した。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。倫理面への配慮 所属研究機関の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。動物実験は所属機関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、餌水分補給を行った。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。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

結核菌由来 miRNA の研究について、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。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。薬剤耐性結核菌株における菌由来 miRNA の解析について、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 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。

GBP ファミリーのクロモゾーム 3、5 遺伝子をそれぞれ全て欠失させたマウスを作製することに成功した。GBP クロモゾーム 3 欠失マウスからマクロファージを単離し、IFN-gamma 刺激依存性の GBP1, 2, 3, 5, 7 遺伝子の mRNA の発現をノーザンブロット法により解析したところ、全ての遺伝子の発現は認められず、GBP ファミリー遺伝子全てを欠失させたマウスの作製に成功した。次に、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。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-1 β /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- γ 産生を解析した。その結果、AIM2 欠損マウスでは、IFN- γ 産生が野生型マウスに比べて有意に低下していた。さらにそのメカニズムを解析した。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-1 β , IL-18 分泌が認められなかった。また caspase-1 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。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、マクロファージや好中球を中心とした炎症性細胞の著明な浸潤

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 PD-1 を介した抑制性シグナルが伝達されないため、感染 3 週目以降の結核菌に対する防御免疫が過剰に誘導され、その結果組織障害を伴う炎症反応が惹起されると共に、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。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、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の死亡は観察されなかった。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。さらに、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。正常マウスに結核菌を経鼻感染させると、感染後 9 ヶ月で死亡するマウスが観察されるようになり、感染後約 1 年で全てのマウスが死亡した。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 週後の肺内生菌数の増加が観察された。また、肺における IFN- γ および TNF- α 産生も結核菌感染のみの場合と比較して高い傾向にあった。さらに、抗 PD-1 抗体を投与した結核菌感染マウスは感染約 7 ヶ月後より死亡が認められ、感染後 10 ヶ月で全てのマウスが死亡した。一方、マウスを予め BCG 免疫した後結核菌を感染させた群では、結核菌のみを感染させた群と比較して感染 4 週後の肺内生菌数は明らかに少なく、感染後 1 年を経過した時点でマウス生存率は 100% であった。また、結核菌感染 2 週間より IFN- γ や TNF- α などのサイトカインおよび各種ケモカイン (MCP-1, MCP-3, IP-10) 産生が誘導され、感染 4 週間でもそれらの産生は持続して認められた。しかし、そのレベルは結核菌単独感染群および結核菌感染後に抗 PD-1 抗体を投与した群と比較すると低いことが示された。さらに、BCG 免疫後に抗 PD-1 抗体を投与し、その後結核菌を感染させた群では、BCG 免疫のみの場合と比較して結核菌感染 4 週後の肺内生菌数に有意な違いは認められず、各種サイトカインおよびケモカイン産生においても抗 PD-1 抗体投与の効果は明らかではなかった。しかし、結核菌感染後 17 ヶ月経過した時点での生存率は 80% であり、BCG 免疫単独群 (この時点での生存率は 20%) と比較して明らかな違いが認められた。

結核菌由来の MMP-II (MMP-II (MTB)) と本 MMP-II と BCG 由来の HSP70 の融合蛋白 (Fusion (MTB)) を用いて樹状細胞を刺激すると、樹状細胞表面の MHC 抗原、CD86・CD83 抗原の発現が上昇した。両者を比較すると Fusion (MTB) でより強い発現が誘導された。また、MMP-II (MTB) 及び Fusion (MTB) で樹状細胞を刺激すると IL-12p40 の産生が誘導され、さらに、刺激直前に樹状細胞表面を TLR2 に対する抗体で処理すると IL-12 の産生は有意に低下した。また、樹状細胞に精製蛋白をパルスし、抗原提示細胞として用いると、ヒト末梢 CD4 陽性 T 細胞を非常に強く活性化した。その際にも Fusion (MTB) が有意に強く T 細胞を活性化した。Fusion (MTB) によるナイーブ CD4 陽

性 T 細胞の活性化は、抗原特異的であって、抗原パルス樹状細胞の表面を MHC class II あるいは CD86 抗原に対する中和抗体で処理することで、T 細胞の活性化は有意に抑制された。また、MMP-II に対する抗体を用いても、T 細胞の活性化は抑制された。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化はパルスした MMP-II に依存した反応であることが判明した。MMP-II (MTB)・Fusion (MTB) は樹状細胞を介してヒトメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞をも活性化した。MMP-II (ML)・MMP-II (MTB)・Fusion (ML)・Fusion (MTB) の 4 種を比較すると、Fusion (MTB) が最も強く未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化した。Fusion (MTB) による未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化も抗原特異的反応であった。また、結核菌 H37Ra 及び H37Rv を樹状細胞及びマクロファージに感染させると細胞表面に MMP-II が発現した。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、rBCG (BCG-DHTM 及び BCG-dHCM) のナイーブ T 細胞の活性化能を検討した。rBCG は、ともに非常に強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。rBCG 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 rBCG による CD4 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、rBCG 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、rBCG のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化を検討すると、rBCG は、ともに強くナイーブ 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た。rBCG の T 細胞活性化機構を解析するため、rBCG の抗原提示細胞活性化能を評価した。rBCG 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、rBCG は樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。rBCG 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

に rBCG を感染させると、rBCG 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、rBCG 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、rBCG は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す、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 rBCG 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 rBCG 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。

TAF7 が Th1 分化誘導活性を有しているか遺伝子強制発現系を用いて検討した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Th null 条件下にて抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し、TAF7 が導入された細胞を分取し、*ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを解析した。その結果、TAF7 が導入された細胞でのみ *ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングが誘導された。次に、TAF7-miRNA を T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞に導入することで TAF7 欠損-T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を作出し、Peptide-25 が誘導する Th1 分化における内在性の TAF7 の関与を検討した。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⁺ T 細胞に導入し、Th null 条件下で Th 分化を誘導した。その結果、TAF7-miRNA が導入された細胞 (GFP 陽性細胞) 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。グランザイ

ム B の発現を伴う CD8⁺ T 細胞の機能的 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⁺ T 細胞と樹状細胞との IFN- γ 、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をこれまでに明らかにしてきた。そこで、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、APL 刺激では誘導されず Peptide-25 刺激でのみ発現が誘導される因子として 27 種類の候補遺伝子を得た。そのうち CD4⁺ T 細胞に発現誘導される因子であった IL-17F に着目した。まず、IL-17F の発現を mRNA 及び蛋白レベルにて確認した結果、*il-17F* mRNA は Peptide-25 刺激 6 時間及び 12 時間後に発現されていた。また、刺激後の培養上清を経時的に回収し、培養上清中の IL-17F を ELISA 法にて検討した結果、刺激 24 時間後までに Peptide-25 刺激でのみ 1ng/ml 程度の IL-17F が産生されていた。また、刺激 24 時間後の IL-17F 産生細胞を細胞内サイトカイン染色法にて解析した結果、Peptide-25 刺激を受けた CD4⁺ T 細胞が IL-17F を産生していることを確認した。CD4⁺ 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⁺ 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⁺ 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 Peptide-25 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、Peptide-25 と共培養する際に rIL-17F を添加すると機能的 CTL 細胞への分化の頻度が高まった。樹状細胞存在下に P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激し、IFN- γ 、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- γ 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。IL-17F 産生細胞は Peptide-25 刺激で Th1 細胞と共に分化誘導される。そこで、IL-17F 産生細胞の分化誘導に Th1 細胞が分泌する IFN- γ が関与しているか検討した。IFN- γ 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を IFN- γ 欠損樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激し、24 時間後の IL-17F 産生を細胞内染色法にて検討した。その結果、IFN- γ 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された樹状細胞の 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 の分化が誘導された。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、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ 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⁺ 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された樹状細胞も機能的 CTL の分化を誘導した。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⁺ T 細胞を樹状細胞と OVA 存在下に Peptide-25 で刺激した後の CD4⁺ T 細胞表面上の 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。

単波長異常分散法により、結核菌由来 Rv2613c の立体構造を決定した。その結果、Rv2613c は溶液中と同様に結晶中でも 4 量体を形成していた。また、活性中心部位にはリン酸が 1 分子結合していた。Rv2613c の立体構造について、一次構造上の特徴が類似しているヒト由来 diadenosine polyphosphate 加水分解酵素 (Fhit) の立体構造との比較を行った。その結果、サブユニットの立体構造は類似していることが示された。Rv2613c が 4 量体を形成する一方で、Fhit は 2 量体を形成しているが、

Rv2613c の 2 量体部分と Fhit の 2 量体を比較した結果、10 本の β ストランドからなる β シートの構造を中心に有している等、両者の立体構造は共通していた。一方、基質である Ap_4A が結合する部位について比較を行ったところ、Rv2613c と Fhit の基質結合部位は異なっていることが示された。Fhit は 1 つのサブユニットに 1 つの基質が結合しているが、Rv2613c では特徴的な 4 量体構造を利用して、サブユニット間の結合が基質の結合に関与していることが示された。特に、活性中心部位が存在するサブユニットとは別のサブユニット中に存在する 160 番目の Trp 残基が基質である Ap_4A のアデニンとスタッキング相互作用を形成していることが予想された。そこで、160 番目の Trp 残基を Ala 残基に置換した変異体を作製してその活性を測定したところ、酵素活性は失われていた。従って、160 番目の Trp 残基周辺の構造は Rv2613c の活性発現にとって重要であることが示唆された。さらに、Rv2613c の活性中心部位近傍に存在している 149 番目の Ala 残基と活性との関連について調べるため、この Ala 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、149 番目の Ala 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、この変異体では 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、Rv2613c の立体構造情報から、149 番目の Ala 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。Rv2613c の特異的な基質結合部位を標的部位としたドッキングシミュレーション解析を行った。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 の標的

部位との間の相互作用エネルギーを計算した。エネルギー計算結果から、Rv2613c の標的部位と結合することが予想された約 40 種類の化合物を候補化合物として選択した。選んだ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、化合物の選択を行う段階で、既に毒物・劇物の指定を受けている化合物は候補から除外した。ドッキングシミュレーション解析の結果から、Rv2613c の標的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。また、他の 2 種類の化合物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。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_4A 加リン酸分解酵素である MAV_3489 と MSMEG_2932、並びに *S. cerevisiae* 由来 Ap_4A 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 種類の化合物は MAV_3489、MSMEG_2932、及び APA1 の酵素活性も顕著に阻害した。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。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 種類の化合物は Rv2613c の活性のみを阻害し、残りの 1 種類の化合物は 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。

D. 考察

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。

GBP クロモソーム 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のが期待されたが、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。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。AIM2 欠損マウスは、結核菌感染に対する感受性が高くなることを明らかにした。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-1 β 、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。

PD-1 欠損マウスが結核菌感染に対して感受性を示す原因について、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解析した。その結果、結核菌感染後の PD-1 欠損マウスの肺では炎症性サイトカインやケモカイン産生の亢進、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形成されていることがわかった。また、PD-1 欠損マウスの肺では IFN- γ 産生能を有する抗原特異的 CD4⁺ T 細胞数が増加し、この細胞を移入されたマウスは結核菌に対する感受性が亢進することが示された。これらの結果は、PD-1 を介した抑制性シグナルが働かないと、結核菌感染後の肺では抗原特異的 CD4⁺ T 細胞が過剰な炎

症反応を惹起するため、感染した菌を制御することができなくなることを示しており、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ための重要な役割を果たしていることが示された。また、結核感染の慢性期に抗 PD-1 抗体を投与しても菌の感染動態には影響がないことが報告されていることから、結核菌感染では PD-1 を介したシグナルはナイーブ CD4⁺ T 細胞のエフェクター細胞への分化を正常に誘導するために必要であり、すでにエフェクター/メモリー細胞に分化した細胞の機能制御にはその効果を発揮しないことが考えられた。結核菌感染とは異なり、BCG 感染の場合には PD-1 経路の障害は菌の排除を亢進させることが示されており、PD-1 を介したシグナル制御が BCG ワクチン効果の増強に繋がると考えられる。さらに、PD-1 欠損マウスに BCG 免疫すると、その後の結核菌の攻撃感染に対する抵抗性が増強することがわかっている。また、少なくとも BCG 感染では結核菌感染でみられる炎症反応による肺の組織傷害は観察されず、PD-1 シグナル経路の障害が感染の増悪には結びつかないことが示されている。本研究によって明らかになったこれらの知見を基に、今後は PD-1 を介したシグナル制御のワクチンへの応用を可能にするため、更に詳細な解析を行い、PD-1 シグナルの障害によるメリット・デメリットを明らかにすることで結核に対するワクチン開発に有用な情報を提供していく予定である。

BCG がワクチンとして充分効果を発揮できない最大の原因は、BCG は生きた抗酸菌であり、抗原提示細胞に取り込まれるとファゴソームを形成し、ライソソームとの融合を阻止することにある。そのため、BCG 由来の抗原は抗原提示細胞の表面に発現されず、T 細胞の抗原特異的活性化が損なわれてしまう。とりわけ、クロスプレゼンテーションを有効に利用することができず、未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化することは極めて難しい。BCG のこの欠点を凌駕するためには、感染した細胞のファゴソームの

中で主要抗原を分泌させ、分泌された蛋白をライソゾーム及び細胞質へ移動させることが必要である。したがって、抗酸菌感染症に対するワクチン開発に当たっては、抗原性に富んだ主要抗原を同定することが極めて重要である。この点において、結核菌由来 MMP-II 及び HSP70 との融合蛋白は、TLR2 を介し樹状細胞を活性化する能力を有し、未感作の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力を持っていたことから、主要抗原としての役割を果たすことが充分期待できる。また、BCG ワクチン接種を受けた日本人正常健康者（結核菌の潜伏感染の有無は不明）のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞は MMP-II 抗原により感作されている可能性が考えられた。さらに、結核菌を樹状細胞やマクロファージに感染させると、その細胞表面に MMP-II 抗原が発現したことから、MMP-II はヒト生体内で T 細胞により認識され得る蛋白であることを示し、さらに結核菌感染を受けた抗原提示細胞はヒト CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し得る可能性があることを示唆している。また、これまでのハンセン病に対するワクチン開発研究において、MMP-II または HSP70-MMP-II 融合蛋白を BCG に組み込ませた rBCG は、親 BCG に比し有意に強くらい菌の増殖を抑制することを見出している。したがって、結核菌由来 MMP-II は結核に対するワクチンとして極めて有用な役割を果たすことが可能と期待される。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得る欠点を持っている。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。BCG 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。IFN- γ はマクロファージを活性化して結核菌の殺戮を誘導するとともに、Th17 の活性化を抑制して好中球の肺内集積を抑制して急性炎症を抑制する上で極めて重要な役割を果たしている。したがって、抗結核ワクチンは、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し効率的に IFN- γ を産生する能力を有している必要がある。BCG-DHTM に比し、よりポリクローナルに T 細胞を活性化する目的で、GSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白をウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に導入し、新しくリコンビナント BCG (BCG-dHCM) を産生した。BCG-dHCM は、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、大量の IFN- γ を産生した。さらに、BCG-dHCM をマウスに接種すると、HSP70・MMP-II のみならず Cys0 及び結核菌の細胞質蛋白に反応するメモリー T 細胞を産生した。BCG-DHTM においても未感作 T 細胞を活性化して IFN- γ の産生を誘導したが、抗原性因子として HSP70 と MMP-II を用いた。HSP70・MMP-II 遺伝子は共に結核菌のみならず BCG にも存在するために病原性因子としては考えにくい。これに対して、BCG-dHCM では活性化した結核菌に発現する Cys0 を導入し、Cys0 に直接的に作用し得るメモリー T 細胞が産生可能であった。したがって、BCG-dHCM はワクチンとしての必要条件を満たしており、