

# [ ] アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者 TLR・リボカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究

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

結核菌の病原性因子 ESAT -6がマクロファージ内で、貪食胞の機能に関わる分子 LAMP -1と会合し、何らかの分子機構で LAMP -1を分解し、貪食胞の成熟をブロックしていることが示唆された。

自然免疫応答に関わる Absent in Melanoma 2 (AM2)の遺伝子欠損マウスは、結核菌に対する感受性が高くなった。その分子機構として、AM2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-1β, 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、結核菌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。これまでに、マウスを用いた我々の解析から、リボカリン2や SLPIなどの分子群が、結核感染における自然免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになっている。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し、多剤耐性結核菌に対する、自然免疫系の活性化を利用した新規治療ワクチン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

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞の成熟を抑制し、増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT -6が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる M. bovis BCG株で欠損していることが知られている。ESAT -6は、T細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、マクロファージの機能に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT -6が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。GST融合 ESAT -6タンパク質を作製し、これをマクロファージ細胞株 RAW 264.7細胞の溶解液と混合し、その後 GST pull downを行うことにより、ESAT -6に会合する宿主分子の同定を試みた。

細胞内 DNA センサーとして同定された Absent in Melanoma 2 (AM2)の結核感染における役割を、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した。

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

GST融合 ESAT -6タンパク質を用いた GST pull down解析で、ESAT -6に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来 ESAT -6に相互作用することが報告されている、TLR2, MHC class I分子が同定された。このことから、この解析系は、ESAT -6の会合分子を解析するのに適した実験系であることが示唆された。そこで、さらにプルダウンされてきたタンパク質のシークエンスを行った結果、これら分子以外に LAMP -1を同定した。次に、LAMP -1と ESAT -6 遺伝子をそれぞれ動物細胞様発現ベクターに組み込み、HEK293細胞に導入し、免疫沈降法により両分子の会合を解析した。その結果、ESAT -6を発現した細胞では、LAMP -1の発現が抑制されることが明らかになった。また、ESAT -6の種々の deletion mutantを発現させた解析から、ESAT -6の N末端から 30-60塩基の領域が、LAMP -1の発現抑制に関与することが明らかになった。

AM2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、AM2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 AM2欠損マウスで有意に増加していた。このように、AM2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。AM2はインフラマゾームを活性化させ、IL-1β/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、AM2欠損マウスでは全く上昇しなかった。IL-18は Th1 応答に関与していること

が知られているので、次に結核感染3週後の脾臓のCD4陽性T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を解析した。その結果、AM2欠損マウスでは、IFN $\gamma$ 産生が野生型マウスに比べて有意に低下していた。

さらにAM2の結核感染防御機構を解析した。AM2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IL1 $\beta$ , 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Hoechst33342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Rab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。

結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が著明に蓄積した。ヒアルロン酸合成酵素HAS1/HAS3の発現が結核菌感染によりマクロファージや肺胞上皮細胞で高くなった。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

結核菌の病原性因子として知られているESAT-6に会合する分子として、LAMP-1を同定した。ESAT-6を哺乳類細胞に発現させると、LAMP-1の発現が抑制されることから、結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞内で分泌されたESAT-6が、貪食胞の成熟に関与するLAMP-1と会合することにより、LAMP-1タンパク質を何らかの分子機構で分解し、その結果、貪食胞の成熟を抑制していることが示唆された。今後、ESAT-6がどのような機構でLAMP-1の発現を抑制するかを解析していく。

AM2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。AM2は細胞内でDNAを認識し、インフラマゾームを活性化し、IL1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、AM2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、AM2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。

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。

#### E. 結論

結核菌の病原性因子ESAT-6が宿主マクロファージ内での貪食胞の成熟に関与するLAMP-1を会合することを見出した。ESAT-6を発現させるとLAMP-1の発現が抑制されることを見出した。

AM2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。

HAS1欠損マウスは、結核菌に対する感受性が亢進していた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

#### 2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 2013 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists 2013. 11. 7-8, Seoul, Korea
2. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. FMSA International Symposium on Autoimmune Diseases, 2013.10-17-20, Beijing, China
3. Kiyoshi Takeda Innate immune responses and gut homeostasis. The 33<sup>rd</sup> Korean College of Rheumatology Annual Scientific Meeting. May 10-11, 2013, Seoul, Korea
4. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Immunology 2013, May 3-7, 2013, Hawaii, USA
5. Kiyoshi Takeda Host-microbial interplay. 42<sup>nd</sup> JSI Annual Meeting 12. 11-13, 2013, Chiba
6. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity and lymphoid tissues in the appendix. Gremany-Japan Immunology Seminar 2013. 12.5-8, 2013 Shizuoka Japan
7. Kiyoshi Takeda Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention. 5<sup>th</sup> India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bangalore, India
8. Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The 4<sup>th</sup> AsiaHORCs Joint Symposium, Buyeo, Korea, November 11-14, 2012
9. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo
10. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 34<sup>th</sup> Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan
11. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 7<sup>th</sup> RCAI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama
12. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo
13. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo
14. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Regulatory Mechanisms of Immune Responses to Intestinal Bacteria. Keystone Symposium. Mar 4-8, 2012. Keystone, USA
15. Kiyoshi Takeda, Regulation of gut

### 3. その他 なし

- homeostasis by microbiota and innate immunity. The 4<sup>th</sup> Symposium of Immunological Self. Jan 27-28, 2012, Kyoto, Japan
16. Kiyoshi Takeda. Innate immune responses to mycoacterial infection. The 46<sup>th</sup> U S- Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Dec 7-9, 2011, Saitama, Japan
  17. 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
  18. 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
  19. Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30- July 1, 2011. Wellington, New Zealand
  20. 竹田 潔、慢性疼痛の病態理解のための免疫・炎症メカニズム。第6回日本運動器疼痛学会、2013年 12月 7- 8日、神戸
  21. 竹田 潔、腸管免疫の謎を解く。日本消化器病学会2013、2013年 10月 11日、東京
  22. 竹田 潔、腸内環境因子と炎症性腸疾患—基礎研究の立場から—。第50回日本消化器免疫学会総会、2013年 8月 1-2日、東京
  23. 竹田 潔、免疫系と腸管環境相互作用による腸管炎症の制御機構。第34回日本炎症・再生医学会、2013年 7月 2- 3日、京都
  24. 竹田 潔、自然免疫系による腸管炎症の制御機構。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013年 6月 28- 29日、長崎
  25. 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 20日、福岡
  26. 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 24日、横浜
  27. 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 12日、大阪
  28. 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 13-14日、京都
  29. 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
  30. 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