

**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**

長期保存結核菌株の細菌学的解析

研究分担者 御手洗 聡 （結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部）
研究協力者 星野 仁彦 （国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部）
研究協力者 山田 博之 （結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）
研究協力者 加藤 朋子 （結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）
研究協力者 青野 昭男 （結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）
研究協力者 近松 絹代 （結核予防会 結核研究所・抗酸菌レファレンス部・細菌検査科）

研究要旨

【背景】結核菌は生体内で潜在感染状態となり、場合によっては感染から数十年後に発病する。感染制御の目的から長期の潜在感染の生物学的動態を詳細に知る必要がある。結核研究所には 1960 年代から低酸素状態で長期培養されている結核菌が保存されており、一つの長期潜在感染状況モデルとして解析可能である。

【目的】結核研究所で低酸素状態にて長期間培養されている結核菌を使用し、形態学的あるいは遺伝学的解析を行う。

【方法】長期低酸素培養結核菌 NN15, 16, 17 及び 19 について直接 RNA 抽出を行い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、回収・増殖させた NN15 を酸素濃度 2.5%, 5%, 10% で 21 日間培養し、RNA を抽出して上記と同じ条件で発現解析を行った。さらに形態を比較検討するため、L-glycine 及び Lysozyme/Driserase を含む培地で結核菌 H37Rv を培養し、プロトプラストを作成して染色性及び形態を観察した。

【結果】NN15, 16 及び 17 には相互に発現に類似性があり、検体としての再現性が認められた。また異なる酸素濃度で短期的に培養された NN15 株も相互に高い発現類似性をしめしたものの、長期低酸素培養 NN15 株の発現とは異なるプロファイルであることが示された。結核菌のプロトプラストは抗酸性を示さず、形態的にも長期低酸素培養結核菌と類似していたが、リボソームの密度は保たれていた。

【考察・結論】長期低酸素培養結核菌は検体として再現性をもち、今回の解析は定量性の点で問題があると思われるものの、短期的に作成された低酸素休眠菌とは異なる発現プロファイルであると考えられ、標本として特異的と思われた。

A. 研究目的

結核菌は宿主において潜在感染する。しかしながら、潜在感染状態（あるいは無症候感染状態・Sub-clinical infection）の実態は良く理解されているとは言いがたい。潜在感染状態にある結核菌の性状を理解することは、効果的な潜在性結核感染症の診断及

び治療にとって極めて重要である。

結核研究所には 1960 年代から低酸素状態にて長期間培養されている結核菌が保管されており、長期休眠状態のひとつの状況をあらかずモデルと考えられる。この研究班では、これらの結核菌に関して表現形質的、形態学的、遺伝学的解析を行うことを

目的とする。

休眠結核菌の表現型・形態及び遺伝学的情報を相互に比較することにより、潜在結核感染状態についての新たな知見を得ることができると期待される。

2012年度までに、当該長期培養株が比較的低酸素（大気圧の約50%）であり、一般的な1%酸素濃度で作成するWayne modelの休眠結核菌とも遺伝子発現状態が異なっていることが示された。これを元に、2013年度は長期低酸素培養株間の再現性の評価と、酸素濃度による長期培養株の遺伝子発現状態の再現を試みた。

B. 研究方法

[長期培養結核菌株間の再現性解析]

1. 対象長期低酸素培養株

実験に使用する結核菌は結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科に1960年代から低酸素培養状態で保存されているM. tuberculosis H37Rv 4株を使用した。長期培養・保存株はソートン培地に接種後、流動パラフィンを上層して酸素の供給を遮断し、そのまま密栓して37℃で培養を継続しているもので、それらの詳細は以下の通りである。

実験対象検体（NN: 新規検体番号，BN: バッグ番号，菌種，培養開始年月日）

NN15/BN22: M. tuberculosis H37Rv, 1968/4/17

NN16/BN24: M. tuberculosis H37Rv, 1968/4/17

NN17/BN25: M. tuberculosis H37Rv, 1968/4/17

NN19/BN8: M. tuberculosis H37Rv, 1974/2/5

培養ボトルを開封し、流動パラフィンとソートン培地中間に層状に発育している油膜状のH37Rvを回収し、Tween 80加Middlebrook7H9培地に懸濁し、3,000G, 20min遠心して集菌した。これを改めてマイコプロス培地（極東製薬）及び2% Kudoh培地（極東製薬）に接種し、37℃で培養を行った。

2. 長期培養結核菌等からのRNAの分離回収

上記の結核菌について、採取した結核菌から直接RNAの分離回収を実施した。上層された流動パラフィンごと培養菌層を回収し、Chloroform/Ethanol (2:1)にて一度洗浄した。抽出にはTRIzol®Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen)を使用した。具体的には95℃に加熱したMax Bacterial Enhancement 0.2mlを回収した結核菌と混和し、チューブを95℃で4分間加熱した。その後1mLのTrizolを加え、よく混和し、5分間室温に静置した。0.2mLの冷クロロホルムを加え、15秒間激しく振盪し、さらに室温に2~3分放置した。12,000g, 4℃で15分間遠心した後、上層を新しい1.5mLのチューブに移した。次に0.5mLのice cold イソプロパノールを加え、転倒混和した。室温で10分間静置した後、15,000g, 4℃で10分間遠心を行った。上清を除去し、1mLの75%エタノールで再懸濁し、7,500g, 4℃で5分間遠心し、上清を捨てRNAペレットを風乾して回収した。さらにDNaseにて2回処理を行った。

3. 結核菌用全転写産物発現解析アレイ解析

マイクロアレイによる結核菌の遺伝子発現解析にはAgilent社のカスタム合成マイクロアレイを用いた。上記で精製したRNAでは直接発現解析を実施可能なほどの検体が得られなかったため、Whole Transcriptome Amplification (Ovation RNA amplification system V2, NuGEN Technologies)でcDNAを増幅し、その全量を用いてSureTag DNA Labeling kit (Agilent)を用いてラベリングを行った。ハイブリダイゼーションはAgilent社の推奨プロトコルに従った。

得られたデータはバックグラウンドノイズを補正後quantile法により正規化し、相互に比較を行った。

[酸素濃度変更による長期低酸素培養株の発現状態の再現]

1で回収した長期低酸素培養菌(NN15株)から得られた活動性結核菌を用いて酸素濃度をコントロール可能なチャンバーを用いた休眠菌作製を実施した。具体的にはMiddlebrook7H9 + Tween80培地にてOD = 0.2 (530nm)に培養した増殖期の結核菌を酸素分圧2.5%、5%及び10%の状態に21日間培養し、有機溶媒洗浄を除いた2の方法でRNA抽出を実施した(共同研究者:星野仁彦)。抽出したRNAを用いて、3の方法と同様に遺伝子発現解析を実施した。

[結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株の形態比較]

有働が1981年に報告した迅速発育菌のプロトプラスト作成法を応用し、結核菌H37Rvを用いてプロトプラスト様の菌体を作成した。使用した培地の組成は以下の通りである。

Protoplast 作製用培地 (1 L)

Sucrose, 120g
 Glucose, 10g
 L-glycine, 12g
 Amino acid mixture 10ml (L-arginine, L-histidine, and L-leucine, 5 mg/ml each)
 K₂SO₄, 1g
 MgCl₂·6H₂O, 2.03g
 CaCl₂·2H₂O, 3.68g
 KH₂PO₄, 0.1g
 0.5M TES buffer (pH 7.2) 50ml
 Lysozyme, 0.05g
 Driserase, 20 0.03g

上記培地中でH37Rvをおよそ3週間培養し、Ziehl-Neelsen染色にて抗酸性を確認し、さらにMiddlebrook7H9+OADC培地に再接種し、発育した結核菌の形態と染色性を確認した。

倫理面への配慮

本研究は結核菌のみを利用した実験室内での研究であり、倫理的要素を含まない。

C. 研究結果

[長期培養結核菌株間の再現性解析]

NN15、NN16、NN17及びNN19株について発現解析結果が得られた。このうちNN19株については発現を検出できない遺伝子が多数認められたため、解析上不適当と考えて対象から除外した。NN15を基準として、NN16及びNN17と各遺伝子の発現量についてt検定を行った。結果として、NN15とNN16の発現には相関係数0.831が認められ、 $p = 0.823$ であった(図1)。NN15とNN17との相関係数は0.322で $p = 0.770$ であった。Wilcoxonの符号付順位検定でもそれぞれ $p = 0.232$ 及び $p = 0.514$ であり、各対応に有意差はないと考えられた。

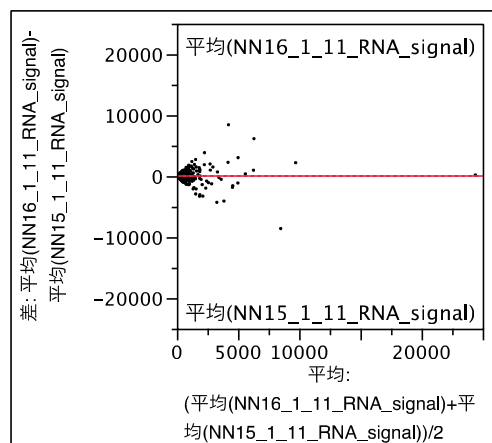


図1 NN15とNN16の発現相関

[酸素濃度変更による長期低酸素培養株の発現状態の再現]

長期低酸素培養NN15株(長期NN15)から直接RNAを抽出した検体と、酸素濃度を2.5~10%で調整して短期(21日間)培養したNN15(短期NN15 O₂ 2.5%、5%及び10%)についてデータを正規化し、相互比較を行った。クラスター解析により、短期NN15の5%及び10%酸素培養株の発現状態が最も近似しており、次いでそれらの株と短期2.5%酸素培養株の発現プロファイルが近似していた。t検定では短期NN15 O₂ 2.5%と5%の間には相関係数0.948が認められ、5%と10%の間には相関係数0.942が認められた。長期NN15株と短期培養株との間の相関係数は、2.5%、5%及び10%のそれぞれについて、0.502、0.462、0.500であり、t検定上は有意差がないものの、Wilcoxon検定で

は各々の組み合わせで $p < 0.0001$ の有意差が認められた。

酸素濃度と発現の関係を解析するため、短期培養株間での発現の変動を解析した。酸素濃度の上昇に従って発現が増加する遺伝子群が 897、逆に低下する遺伝子群が 1,356 認められた。正規化後の発現量を \log_2 変換し、1 以上の発現差が線形に（単調減少あるいは単調増加）観察された遺伝子群を表 1 に示した。

表 1 酸素濃度により 2 倍以上の単調増加あるいは単調減少を示す遺伝子群

単調増加	単調減少
Rv1734c	Rv1119c
Rv2104c	Rv2304c
Rv1813c	Rv0233 (<i>nrdB</i>)
Rv0307c	Rv1795
Rv2021c	Rv0067c
Rv0617	Rv0390
Rv1404	Rv1275 (<i>lprC</i>)
Rv1176c	Rv0038
Rv1951c	Rv0602c (<i>trcA</i>)
Rv1395	Rv0015c (<i>pknA</i>)
Rv0030	Rv3322c
Rv0591 (<i>mce2C</i>)	Rv0235c
	Rv0993 (<i>galU</i>)
	Rv0521
	Rv0738

[結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株の形態比較]

長期低酸素培養結核菌の形態を検討するために、同様に抗酸性の低下・消失したプロトプラストを作成し、比較を行った。

プロトプラスト用 P 培地で培養した H37Rv は発育が遅かったものの、3 週間程度で適度な濁度まで発育した。形態的には図 2 のようにほぼ球菌～桿菌の形態であった。また Z-N 染色で定型的抗酸性を示さなかった（図 3）。

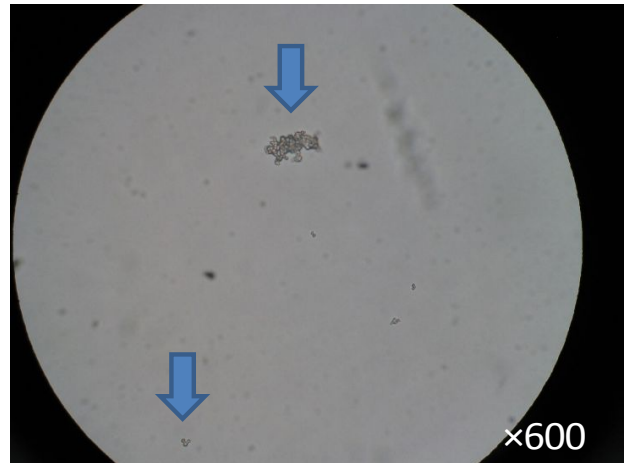


図 2 プロトプラストと思われる結核菌の光学顕微鏡下での形態（矢印：600x）

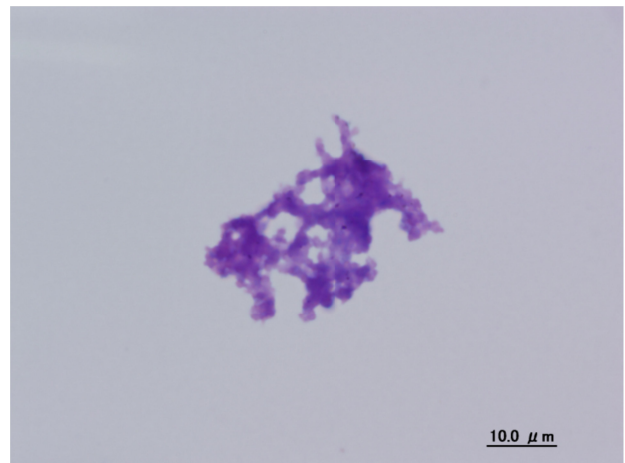


図 3 プロトプラスト（と思われる）結核菌の Ziehl-Neelsen 染色写真

図 3 の結核菌を Middlebrook 7H9 培地に再接種したところ、通常の桿菌形態となり抗酸性も再獲得された。

結核菌プロトプラストと長期低酸素培養株を電子顕微鏡下で比較すると（図 4）、長期培養株及びプロトプラストは増殖期の結核菌に比べて内部構造が単純化しており、細胞壁の厚さも異なっていて形態的にも一定でない。しかしながら、プロトプラストではリボソームと思われる顆粒が増殖期の結核菌と同程度観察されるのに対し、長期培養菌では殆ど認められなかった。

D. 考察

長期低酸素培養結核菌の遺伝子発現状態について本年度も継続して解析を行った。長期低酸素培養結核菌の形態的变化を検討

するため結核菌のプロトプラスト作成を試みた。結果として形態及び染色性で両者は類似性を示しており、この結果から考えて、RNA 抽出時には脂質の除去さえ適切に行えば単純な Trizol 抽出で十分である可能性が考えられた。

昨年度解析を実施した長期培養株(NN15)の異なる標本での発現の再現性について新たに3株を用いて解析したが、1株は標本の培養・保存状態あるいはRNAの回収に問題があったためこれを除外し、他の2株との比較を行った。結果として同時期に作成した長期培養結核菌株の遺伝子発現は株間でほぼ同等であり、再現性はあるものと考えられた。

一方、異なる低酸素状態で短期的に作成した結核菌株の遺伝子発現は、短期培養株間では高度な発現類似性があったものの、酸素濃度により2倍以上の発現変化(増加あるいは減少)を示す遺伝子群も認められた。Galaganらが2013年にNatureに発表した低酸素から好気培養への移行時の遺伝子発現と比較すると、脂質代謝に関連するRv3281 (accE5)や Rv399c (accD4)、Rv1483 (fabG1)などは酸素濃度に従って up-regulate されていたが、Transcriptional factor で低酸素時に up-regulate されていると考えられている Rv2711 (ideR)や Rv3133c (devR)では必ずしも低い酸素濃度で相対的に高発現していなかった。この結果は昨年解析した長期低酸素培養 NN15 株の直接発現解析と、同じ株で新たに作成した1%低酸素培養及び好気条件培養での発現解析の比較でも同様であった。今回比較的短期間に低濃度酸素条件で作成した休眠結核菌モデルが長期低酸素培養菌と異なった遺伝子発現プロファイルを示したことと併せて考えると、長期低酸素培養株は解析対象としてユニークであり、低酸素条件と好気条件の混在を示唆していると考えられた。

今回得られた結果から長期低酸素培養結核菌の特異性と検体の再現性が示されたことから、引き続き長期低酸素培養結核菌の発現データを解析し、リアルタイムPCR等で定量的に変動を確定する必要があると考

えられた。

E. 結論

1968年から37で低酸素培養を継続している結核菌 H37Rv 株について、異なる株間での遺伝子発現での類似性(再現性)を確認し、同時に短期低酸素培養では酸素濃度を複数設定しても同様の発現状態を作成しづらいことが示され、特異性が示された。他の報告との比較などから考えると、長期低酸素培養結核菌は嫌気及び好気状態が混在している可能性があり、遺伝子の発現は均一でなく、総体として既報とは異なるプロファイルを示していることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. Mitarai S, Hoshino Y, Kato T, Aono A, Chikamatsu K, Yamada H. 2013. Gene expression analysis of 40-years' hypoxic culture of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis 2013; 17: S528. 44th world conference on lung health of the international union against tuberculosis and lung disease. (Paris, France. 10月).

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

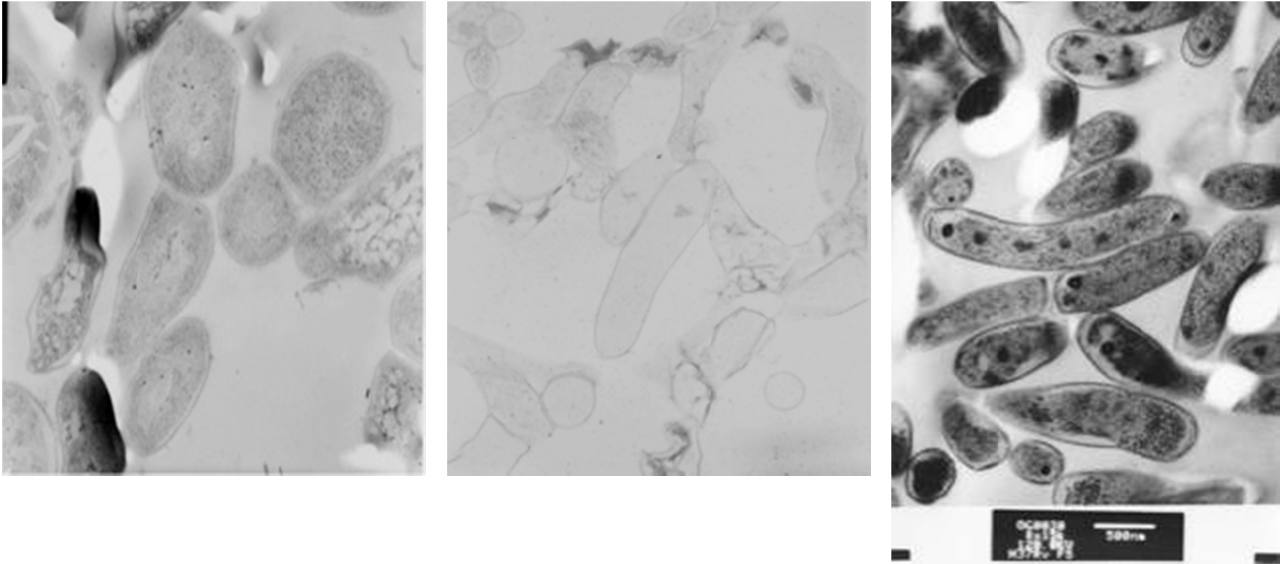


図4 結核菌 H37R_v 株の電子顕微鏡画像(左:プロトプラスト,中:長期低酸素培養 NN15,右:対数増殖期)

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

潜在性結核の成立を担う菌と宿主双方の分子とその機能解明に関する研究

研究分担者	松本 壮吉	（新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学・教授）
研究協力者	岡 真優子	（京都府立大学大学院・食環境安全性学・准教授）
研究協力者	王 亜軍	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・博士研究員）
研究協力者	平山 幸雄	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・研究員）
研究協力者	仁木 満美子	（大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・助教）
研究協力者	尾関 百合子	（園田学園女子大学・人間健康学部食物栄養学科・教授）
研究協力者	大原 直也	（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学・教授）
研究協力者	辻村 邦夫	（浜松医科大学・微生物学・准教授）
研究協力者	小出 幸夫	（浜松医科大学・理事）
研究協力者	北田 清吾	（国立病院機構刀根山病院・医長）
研究協力者	前倉 亮治	（国立病院機構刀根山病院・副院長）
研究協力者	阿戸 学	（国立感染症研究所・免疫部・部長）
研究協力者	小林 和夫	（あそか病院・副院長）

研究要旨

世界人口の 1/3 が、国内では 1/5 が結核菌の無症候感染者である。無症候感染者の 5-10%が将来に結核を発症することから、未発症感染者は潜在性結核とよばれる。潜在性結核は、結核病原体の源泉であり、活動性結核に加え潜在性結核に対処することなしに疾患の制圧は困難である。膨大な無症候感染者に予防投薬を行うのは現実的でないため、発症リスクの高い人を特定できれば、効果的な対策を構築できるが、そのような診断法は現在まで開発されていない。潜在期の結核菌の多くが休眠状態にあることから、我々はこれまで本研究班にて結核菌が休眠期に産生する蛋白質を解析してきた。本成績を元に、増殖期蛋白質に加え休眠期蛋白質に対する免疫応答を測定することによって潜在性結核や発症ハイリスクグループを特定できる可能性がある。特に抗体応答は、生体内の病原体量に比例して増大することから、発症ハイリスクグループを特定できる可能性がある。陳旧性肺結核は、一般の潜在性結核に比べ、結核発症リスクが 5 倍程高いことが知られている。本研究では、非感染健常者、活動性結核患者、陳旧性結核群における、結核菌抗原各種に対する抗体価の測定を行った。その結果、陳旧性結核群において、Antigen 85A と Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に対する有意な抗体価の上昇が観察された。また未発症者の結核種肺切片を用いて、Antigen 85 と MDP1 の発現を確認した。これらの結果から、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体の検出によって結核発症ハイリスクグループを特定できる可能性が示された。

A. 研究目的

無症候の結核菌感染者（潜在性結核、
Latent Mycobacterium tuberculosis infection、

LTBI）は、人類の 1/3、日本人の 1/5 におよんでおり、将来一定の割合で結核を発症する可能性がある。結核菌の住み処はヒトで

あり、活動性結核に加え、潜在性結核に対処しなければ、結核の制圧は困難である。我々はこれまで、厚生労働科学研究費補助金の支援を受け、潜在性結核における潜伏感染結核菌のフェノタイプである休眠菌の性質を、菌側および宿主側双方の責任分子について解析をおこなってきた。休眠菌とは、生体内で主に肉芽腫内の低酸素化によって結核菌が増殖を停止した状態であるが、長期間生存が可能で、現行の抗結核薬が殺傷できない増殖相である。我々は、菌側分子として、発現が増強すると抗酸菌の増殖を停止させる活性がある Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が、結核の一次選択薬であるイソニアジドに対する抵抗性を賦与することを明かにし、昨年度成果を公表した。イソニアジドは結核菌内で菌の酵素である KatG によって活性化されなければならないが、MDP1 は休眠期など静止期以降の抗酸菌で発現が上昇し、KatG の発現を抑制することで結核菌はイソニアジド抵抗性となる（仁木等、J Bio Chem 2012）。一方、結核菌の細胞内増殖を抑制する宿主側分子を同定しそのメカニズムをおおよそ明かにしたが、その結果については論文発表前であるので、今回の報告書には記載を差し控える。

潜在性結核は、人類の 1/3 に及ぶため、近い将来に発症が予測される発症ハイリスク群を特定し、対処することが現実的と考えられる。最も結核発症のリスクが高いのは HIV との重感染者で、非感染者に比べ、およそ 10 倍の発症率（年率 10%）である。次ぎにリスクが高いのが、現行の短期化学療法以外の治療を過去に施されたり、投薬せずに治癒した陳旧性結核群で、一般の潜在性結核に比べ、およそ 5 倍の発症リスクがある。

一方、免疫学的に結核菌感染を検出するには T 細胞応答や B 細胞応答（抗体価）を検査するが、T 細胞応答は長期間記憶される傾向があるのに対して、抗体応答は、病原体の量に応じて変動しやすい性質がある。現在、結核菌感染はクオンティフェロン試験（QFT）など T 細胞応答での検出が主流

であるが、病原体の生体内増殖に鋭敏な抗体応答の検出は、結核の前発症状態、すなわち発症ハイリスク群を特定できる可能性がある。

本研究では、本研究班内での共同研究により、MDP1 など休眠期結核菌が産生している蛋白質抗原に対して発症ハイリスク群である陳旧性肺結核者の抗体価を測定し、非感染健常者や活動性結核群に比べ、有意に抗体産生の標的となっているかを検討した。本研究の目的は、結核発症ハイリスク群を診断するためのバイオマーカー抗原の同定である。

B. 研究方法

各種結核菌蛋白質の発現用組み換え大腸菌をカルベニシリン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有 LB 培地にて培養し、増殖期（吸光度 0.4-0.8）培養菌液に、0.5 mM となるように IPTG を加えて 22 度にて 12 時間、追加培養を行った。培養菌液から遠心操作によって大腸菌体を回収し、ニッケルカラム結合緩衝液にて懸濁した後、大腸菌の超音波破碎を行う。再度、遠心操作にて、不溶性画分を除き、上清を Ni-NTA カラムにアプライした。イミダゾールを 10 ないし 30 mM 含有するニッケルカラム結合緩衝液にてカラムを洗浄することで非結合性蛋白質を除去した後、300 mM のイミダゾールを含有するリン酸緩衝液にて蛋白質の抽出を行った。

精製した結核菌蛋白質をリン酸緩衝液中で 5~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調整し、室温で 2 時間、96 穴プレートに固相化を行った。洗浄後、5%スキムミルクでブロックし、抗体価測定用のプレートとして用いた。

QFT 試験陰性の結核既往歴のない 大阪市立大学医学部学生 17 名（年齢 20-24 歳、男性 9 名、女性 8 名）を非感染健常者とした。活動性結核患者は、QFT 試験陽性で、刀根山病院で痰中に結核菌が検出された 15 名（年齢 35-71 歳、男性 13 名、女性 2 名）を対象とした。5 年以上前に肺結核の既往がある 15 名で現在、痰中に結核菌を認めず、咳・熱などの症状がない者を陳旧性結核とした。陳旧性結核群の年齢は 42-91 歳で、

QFT 陽性率は 33%、男女比は 9 対 6 であった。対象者から試験の同意を得た後、大阪市立大学大学院医学研究科および刀根山病院で採血を行い、遠心分離した血清を試験に用いた。

プレートに各血清を 100 倍希釈して加え、加温後、洗浄し HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を反応、洗浄後、TMB 液を加え発色させ、0.1N の塩酸で反応を停止後、吸光度 450nm で測定した。

ホルマリン固定ヒト肺切片を、パラフィン包埋し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオシン染色、抗酸性（チール・ネールゼン染色）、抗 MDP1 抗体、抗 Antigen85 抗体で染色し、顕微鏡下で観察した。

倫理面への配慮

国立病院機構刀根山病院、大阪市立大学大学院医学研究科での倫理委員会で承諾を得た後、個々の血液提供者に対して説明を行い、同意を得た後に採血し、試験に用いた。

C. 研究結果

ケニア共和国における、ビクトリア湖畔 Mb QFT 試験で用いられている結核菌抗原、ESAT6 と CFP10 に対する血清抗体を検出した。その結果、活動性結核患者において、非感染健常者や陳旧性結核群に比べ有意に高い抗体産生が検出された。ESAT6 については非感染健常者と活動性結核患者および非感染健常者と陳旧性肺結核で有意差が検出された（共に $p < 0.05$ ）。CFP10 については、非感染健常者と活動性結核患者間、および活動性結核患者と陳旧性肺結核間で有意差が検出された（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）。この結果から、T 細胞の IFN-gamma 産生検出同様に、ESAT6 と CFP10 に対する抗体応答は活動性結核患者で顕著であることが判明した。

次に、低酸素センサーである DosR で誘導される蛋白質（DosR-regulon）16 種類について同様の検討を ELISA 法で行った。DosR-regulon の蛋白質は、殆ど抗原性を示さず、抗体を検出できたのは、Rv2031(Acr)

と Rv3132 (DosS) のみであった。Acr については、一定の高い抗体価が認められ、非感染健常者と活動性結核患者間および非感染健常者と陳旧性肺結核間で有意差が検出された（それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ）が、活動性結核患者と陳旧性肺結核間では有意差を認めなかった。DosS に関しては、活動性結核患者と陳旧性肺結核間で有意差を認めたが、全般に抗体価が吸光度 0.2 以下と低く陳旧性肺結核のマーカーには不十分と推定された。

さらに結核菌の主要な分泌蛋白質である Antigen85 や、潜在性結核における免疫応答の増強が報告されている HBHA、Acr の相同体で休眠期での発現が確認されている HrpA、結核菌の生存に必須で増殖抑止能を有する MDP1 など、結核菌の主要な蛋白質抗原について同様に試験を行った。その結果、Antigen 85A、Antigen 85B、MDP1 について、活動性結核患者と陳旧性結核患者で有意な抗体の上昇が検出された。Antigen 85A、Antigen 85B、MDP1 とともに、非感染健常者と陳旧性肺結核間で $p < 0.01$ の有意差が検出された。Antigen 85A と MDP1 については、活動性結核患者と陳旧性肺結核間で有意差を認め（共に $p < 0.01$ ）、陳旧性肺結核患者で高い抗体の産生が認められた。

Antigen85A や MDP1 に対する抗体応答が陳旧性肺結核、すなわち高い結核発症リスク群に対する検出感度を receiver operating characteristic curve (ROC 曲線) を作成して解析した。非感染健常者と陳旧性肺結核を比較した結果、対照とした ESAT6 や CFP10 では、それぞれ 53.3%と 60.0%なのに対し、Antigen85A と MDP1 については 96.5%と 97.3%であった。Antigen85A と MDP1 に対する抗体価測定が、発症ハイリスクグループの検出に有用である可能性が示された。

最後に Antigen85 と MDP1 の未発症者肺での発現を免疫組織学的に検討した。肺がん疑いでバイオプシーを行ったが、結核菌感染による結核種であることが判明した健常者由来の肺組織切片を、HE 染色、抗酸性染色、抗 Antigen85 抗体、抗 MDP1 抗体でそれぞれ染色を行った。その結果、結核種

中央部が抗酸性染色に濃染し、同部位を Antigen85 抗体が若干、MDP1 抗体が強く染色することが分かった。本結果から、未発症の結核菌感染者の結核肉芽腫内で、実際に Antigen85 や MDP1 が産生されていることが判明した。

D. 考察

結核発症ハイリスク群の診断法の開発をめざし、本研究では、非感染健常者、活動性結核患者、陳旧性結核群における、各種結核菌抗原に対する抗体価の測定を行った。その結果、陳旧性結核群において、Antigen 85A と MDP1 に対する有意な抗体価の上昇が観察された。また未発症者の結核種肺切片を用いて、Antigen 85 と MDP1 の発現を確認した。これらの結果から、Antigen 85 と MDP1 に対する抗体の検出によって結核発症ハイリスクグループを特定できる可能性が示された。

Antigen85 は、ミコール酸を糖に転移する酵素で、細胞壁合成に関わり、増殖期に産生が顕著である。しかしながら昨今、本研究班員の杉田などにより、潜在期の結核菌や BCG が、ミコール酸をグリセロールやグルコースに転移していることが示されていることから、潜在期での発現も予測されていた。本研究結果からも、Antigen85 が潜在期に発現し、潜伏結核菌の細胞壁の再構築に関わっていることが示唆された。

一方、MDP1 は抗酸菌の増殖を停止する活性をもつヒストン様蛋白質である。必須分子であるため増殖期にも発現しているが、特に低鉄状態で発現が増強されるため、鉄濃度の低い細胞内では発現が増加すると推定される。MDP1 の強力な発現は、菌の増殖停止を示唆するため高値の抗 MDP1 抗体が、病気の沈静化と相関することも考えられるが、一般に菌は生体内で休眠と増殖を繰り返していることから、ハイリスク群で MDP1 抗体が高いことは、細菌量の増加を示唆し、それは発症の前段階にあると考えられるべきかもしれない。

本研究成果をうけて、今後、システムックに、より多くのポピュレーションで検

討を行う、T 細胞応答との比較検討、前向き研究による発症の有無の検討を実施し、潜在性結核や高発症リスク群診断法を確立すべきと思われる。

E. 結論

Antigen 85A や MDP1 は、結核発症ハイリスク群を診断するための有望なバイオマーカー抗原であることが示された (Osada-Oka et al Microbiol Immunol, 2013)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H., and Matsumoto, S. 2013. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health, in press.
2. Manabu I, Nagi S., Chadeka E., Mutungi F., Osada-Oka M., Ono K., Oda T., Michinori T., Ozeki Y., Dan Justin Yombo K., Okabe M., Niki M., Hirayama Y., Fukui M., Kobayashi K., M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, H. Ogura, Y. Ichinose, SM. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2013. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* and hookworm infections among school children in Mbita, Kenya, J Trop Dis. in press.
3. Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto., H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multicolor Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Related Latent Antigens. Jpn J Infect Dis 66:207-215.
4. Tateishi, Y., A. Tamaru, Y. Ogura, M. Niki, T. Wada, T. Yamamoto, K. Hirata, T. Hayashi, and S. Matsumoto. 2013. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain OM-V02_005. Genome Announc 1 e00608-13.
5. Taniguchi, K., T. Takii, S. Yamamoto, J.

Maeyama, S. Iho, M. Maruyama, N. Iizuka, **Y. Ozeki**, **S. Matsumoto**, T. Hasegawa, Y. Miyatake, S. Itoh, and K. Onozaki. 2013. Reactivation of immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Immun Ageing* 10:25.

6. **Osada-Oka, M.**, Y. Tateishi, **Y. Hirayama**, **Y. Ozeki**, **M. Niki**, **S. Kitada**, **R. Maekura**, **K. Tsujimura**, **Y. Koide**, **N. Ohara**, T. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol* 57:30-37.
7. Fukuda, T., T. Matsumura, **M. Ato**, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, **S. Matsumoto**, **K. Kobayashi**, T. Kinoshita, and Y. S. Morita. 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio* 4:e00472-00412.
8. **仁木 満美子**、**松本 壮吉**. 2013. 鉄代謝およびイソニアジド耐性にかかわる結核菌分子の機能と治療法開発の可能性。化学療法の領域、Vol29 2号、P119-124.

著書

1. 仁木 誠、**松本 壮吉**. 2013. 微生物の簡易迅速検査法、五十君 静信、江崎 孝行、高島 浩行、土戸 哲明 監修、グラム陰性細菌、テクノシステム、東京、161-177.

2. 学会発表

1. **岡 真優子**、**松本 壮吉**、**尾関 百合子**、市川 寛、南山 幸子. 2013. 結核菌感染に対するマクロファージの生体防御機構. 第66回日本酸化ストレス学会.(名古屋市、6月).
2. **岡 真優子**、**松本 壮吉**、**尾関 百合子**、南山 幸子. 2013. 宿主細胞内で増殖する結核菌のエネルギー産生と増殖機構.

第7回細菌学若手コロッセウム.(広島県三原市、8月).

3. Nishiuchi, Y. and **S. Matsumoto**. 2013. *Mycobacterium avium* Infects Human Erythrocytes *in vitro*. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. (札幌、8月).
4. **Osada-Oka, M.**, **S. Matsumoto**, **Y. Ozeki**, Y. Minamiyama. 2013. Ferritin superfamily protein-like activity in mycobacterial DNA-binding protein 1. 6th Joint Meeting of The Societies for Free Radical Research Australasia and Japan. (Sydney, Australia、9月).
5. **松本 壮吉**. 2013. 抗酸菌の潜伏感染や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会.(さいたま市、9月).
6. 戸田 彩季、瀬戸 俊之、時政 定雄、新宅 治夫、**松本 壮吉**. 2013. BCG ワクチン接種が原因と思われる骨髄炎の幼児. 第54回日本熱帯医学会大会.(長崎市、10月).
7. 井上 学、**岡 真優子**、**仁木 満美子**、**尾関 百合子**、一瀬 休生、濱野 真二郎、**松本 壮吉**. 2013. ケニア共和国 Mbita 地区の児童における結核菌感染と鉤虫感染の関連. 第54回日本熱帯医学会大会.(長崎市、10月).
8. **岡 真優子**、立石 善隆、**平山 幸雄**、**尾関 百合子**、**前倉 亮治**、**小林 和夫**、**松本 壮吉**. 2013. 潜在性結核のバイオマーカーとしての抗 Antigen85 および Mycobacteri DNA-binding protein 1 抗体. 第54回日本熱帯医学会大会.(長崎市、10月).
9. 前山 順一、山崎 利雄、山本 十糸子、林 大介、**松本 壮吉**、網 康至、伊保 澄子、山本 三郎. 2013. 結核ブースターワクチンとしての結核菌組換えタンパク MDP1 および TLR9 リガンド G9.1 アジュバントの結核菌噴霧感染による評価. 第17回日本ワクチン学会学術集会.(津市、11月).

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

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

休眠結核菌の糖脂質代謝と免疫応答に関する研究

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所・細胞制御研究分野）

研究要旨

結核菌細胞壁には多量の脂質・糖脂質群が存在し、菌の生存や病原性に深く関わっている。宿主内増殖菌は、宿主体内に高濃度で存在するグルコースを基質としたミコール酸転移反応により、グルコースモノミコール酸（GMM）を新生する（*J. Biol. Chem.* 283: 28835, 2008）。一方、休眠菌は主要な細胞壁糖脂質であるトレハロースモノミコール酸（TDM）や GMM をほとんど産生しない。休眠結核菌モデル（Wayne モデル）を用いたこれまでの研究から、休眠結核菌はグリセロールモノミコール酸（GroMM）の産生を亢進することが明らかとなったが、その生物学的作用は不明であった。GroMM を接種したモルモット皮膚において、顕著な好酸球浸潤を伴った炎症応答が生じる（*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409: 304, 2011）ことから、GroMM を認識する自然免疫受容体の存在を想起し、その同定を試みた。その結果、TDM を認識する C 型レクチンであるヒト Macrophage-inducible C-type lectin（Mincle）が GroMM を認識する主要な受容体であることがわかった。一方、マウス Mincle は TDM を認識するが、GroMM を認識しなかった。そこでヒト Mincle 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、その皮膚に GroMM を接種すると、モルモットで見られたのと同様の好酸球性炎症が誘起された。野生型マウスではこのような応答はまったく観察されなかった。慢性結核病態はヒト・モルモットとマウスで大きく異なるが、その分子機序は明確ではない。本研究により明らかになった GroMM に対する応答の差異は、ヒト慢性結核病態を理解するうえで重要である。

A. 研究目的

ミコール酸は結核菌に代表される抗酸菌に特有の細胞壁脂質であり、他の生物体にはみられない長鎖脂肪酸である。アラビノガラクトタンと共有結合することにより細胞壁骨格を構成するとともに、トレハロースなどの糖修飾を受けた遊離糖脂質として細胞壁内に存在する。TDM は代表的なミコール酸含有糖脂質であり、菌の生育や病原性に関与すると考えられている。さらに TDM は、宿主自然免疫受容体である Mincle や Toll 様受容体（TLR）のリガンドとして機能し、強力なアジュバント作用を有することから、結核免疫病態の形成にも深く関与

している。

興味深いことに、病原性結核菌は生体内において、宿主由来グルコースをミコール酸転移反応の競合的基質として用いることにより TDM 産生を能動的に抑制するとともに GMM を新たに産生する。すなわち、GMM は生体内増殖菌のマーカー脂質として捉えることができる。

一方、休眠結核菌においては、おそらくその低代謝レベルを反映して、TDM や GMM など多くの脂質の産生が著減する。しかし、ごく一部の脂質群はその産生が維持あるいは亢進することが最近知られるようになってきた。なかでもグリセロール骨

格に一分子のミコール酸が付加されたグリセロールモノミコール酸 (GroMM) は休眠菌特有の脂質と考えられ、それに対する免疫応答は潜伏感染の指標となる可能性が示唆されている。

モルモット皮膚に GroMM を接種すると好酸球を中心とした炎症応答が惹起される。したがって、宿主自然免疫系には GroMM を認識する受容体が備わっている可能性が考えられた。この受容体を同定することは、結核潜伏感染の理解に重要と考えられる。そこで、GroMM を認識する宿主自然免疫受容体を同定することを目的として本研究を推進した。

B. 研究方法

BCG の培養 : BCG Tokyo 172 株を、5% グリセロール、0.05% Tween 80、10% ADC エンリッチメントを含有した Middlebrook 7H9 液体培地中で震盪培養した。OD₆₀₀ が 1 ~ 1.5 に達した段階で菌体を回収し、常法 (J Immunol 169: 330, 2002; J Exp Med 200: 1559, 2004) にしたがってクロロホルム / メタノール抽出を行い、脂質分画を得た。この画分を適切な展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) により展開し、GroMM に相当するスポットをかきとって脂質抽出を行った。この操作を 2~3 回繰り返すことにより純度を高めた。分子種はマススペクトロメトリーにより確認した。

リポソームの作製 : ステアリン酸付加オクタアルギニンを構成成分としたリポソームの作製は、既報 (J Biol Chem 286: 16800, 2011) にしたがって行った。GroMM をホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンを 7:3:0.5 の割合で混合し、溶媒を蒸発除去した。得られた脂質膜に蒸留水を加え、ソニケーションによりリポソーム化した。

レポーター細胞 : 2B4-NFAT-GFP レポーター細胞 (J. Exp. Med. 206: 2879, 2009) は山崎晶博士 (九州大学生体防御医学研究所) より恵与を受けた。この細胞に種々の Mincle 遺伝子あるいは変異遺伝子を導入し、リガンド脂質を固相化したプレートで培養

した。24 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞を検出した。

抗ヒト Mincle モノクローナル抗体の作製 : ヒト腎上皮細胞株 293T にヒト Mincle および FcR γ 鎖を発現させ、フロイントアジュバントとともにラットに投与した。3 週後にリンパ節を採取し細胞融合に用いた。293T トランスフェクタントを用いたフローサイトメトリーにより抗体クローンのスクリーニングを行い、ヒト Mincle 特異的抗体クローンを単離した。

ヒト Mincle 遺伝子トランスジェニックマウスの樹立 : ヒト Mincle ゲノム遺伝子断片 (-1.482 kb からエクソン 2 の終わりまで) にエクソン 3 から 6 によりコードされる cDNA を付加してトランスジーンをした。これを C57BL/6 マウス胚に注入し、トランスジェニックマウスを作製した。さらにこのマウスをマウス Mincle ノックアウトマウス (J. Exp. Med. 206: 2879, 2009) と掛け合わせることにより、ヒト Mincle のみを発現したマウス系統を樹立した。

組織化学 : GroMM 皮内接種を受けたマウスから皮膚組織を採取し、常法 (J Immunol 181: 8528, 2008) にしたがってヘマトキシリン・エオジン染色およびギムザ染色を行った。

倫理面への配慮

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、実験実施機関の規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行された。

C. 研究結果

ヒト Mincle は TDM と GroMM を認識する : ヒト Mincle 遺伝子をトランスフェクトした 2B4-NFAT-GFP 細胞を、TDM を固相化したプレートで培養すると、TDM 濃度依存的に GFP 陽性細胞が出現した。非トランスフェクタント細胞ではこのような応答を認めなかったことから、ヒト Mincle による TDM 認識を確認できた。同じヒト Mincle トランスフェクタント細胞および非トランスフェクタント細胞を、GroMM を固相化したプ

レートで培養すると、TDM の場合と同様に前者のみ応答を示し、GroMM 濃度依存的に GFP 陽性細胞が出現した。

一方、マウス Mincle 遺伝子をトランスフェクトした 2B4-NFAT-GFP 細胞は、TDM には顕著な応答を示したが、GroMM に対してはまったく応答性を示さなかった。そこでマウス Mincle において、その細胞外ドメインをヒト Mincle の細胞外ドメインで置換したキメラ分子を発現したリポーター細胞を作製したところ、TDM だけでなく GroMM に対する反応性を示した。また逆に、ヒト Mincle において、その細胞外ドメインをマウス Mincle の細胞外ドメインで置換したキメラ分子を発現したリポーター細胞は、TDM には反応するが GroMM に対する反応性を失うことを確認した。以上の結果から、ヒト Mincle はマウス Mincle と異なり、GroMM を認識する自然免疫受容体として機能する可能性が示唆された。

ヒト Mincle トランスジェニックマウスの作製と解析：上記の 2B4 レポーター細胞を用いた解析はタンパク質過剰発現系であり、生理的な応答を反映していない可能性もある。そこで、ヒト Mincle 遺伝子をゲノムに内在するプロモーターの支配下で発現させたトランスジェニックマウスを作製し、ヒト Mincle による GroMM 認識能を検証した。まずこのトランスジェニックマウスから得たマクロファージをリポ多糖 (LPS) で刺激すると、細胞表面に Mincle 分子の発現が誘導されたことから、マウス細胞においてトランスジーンが発現が適切に制御されていることがわかった。以降、ヒト Mincle トランスジェニック/マウス Mincle ノックアウトマウス (hMincle+ マウス：ヒト Mincle のみを発現)、野生型マウス (mMincle+ マウス) およびマウス Mincle ノックアウトマウス (Mincle null マウス) の 3 群について比較検討を行った。

まず Mincle null マウスより単離した骨髄マクロファージは LPS に応答して腫瘍壊死因子 α (TNF- α) を産生したが、TDM や GroMM にはまったく反応しなかった。mMincle+ マウス由来骨髄マクロファージ

は LPS および TDM に応答して TNF- α を産生したが、GroMM には反応を示さなかった。これに対し、hMincle+ マウス由来骨髄マクロファージは、LPS、TDM、GroMM の 3 者に対して反応性を示した。以上のことから、生理的条件下においてヒト Mincle が GroMM を認識すると結論づけた。

これら 3 群のマウスの皮膚に GroMM リポソームを接種し、2 日後に組織を採取して組織学的解析を行ったところ、mMincle+ マウスおよび Mincle null マウスにおいてはまったく組織応答を認めなかったのに対し、hMincle+ マウスにおいては、多数の細胞の浸潤を認めた。そのうち概ね 40% が好酸球であった。Mock リポソーム接種部位ではそのような組織応答を認めなかった。したがって、GroMM に対する好酸球優位の組織応答は、Mincle 依存的に誘起されると結論づけた。

D. 考察

研究分担者のこれまでの研究成果や他の研究 (Chem. Biol. 16: 82, 2009) から、GroMM が結核休眠菌特有のミコール酸含有脂質であるとの考えが生まれてきた。しかしこの脂質分子の宿主免疫系への作用は不明であった。先行研究 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 409: 304, 2011) から GroMM に対する自然免疫受容体の存在が想定され、本研究においてそれがヒト Mincle であることが明らかとなった。

宿主外環境で生育する菌は TDM を多量に産生する。この菌が生体内に侵入すると、Mincle を介してマクロファージが活性化され、容易に制御される。そこで病原性マクロファージは、宿主由来のグルコースを TDM 合成酵素 (ミコール酸転移酵素) の競合的基質として利用し、GMM を新生するとともに、TDM の発現を低下させる。これはおそらく病原性結核菌の自然免疫回避機構と考えられる。これに対して宿主獲得免疫は、GMM を標的にした CD1 (ヒト CD1b、サル CD1c) 依存的 TH1 応答を誘起し、感染制御を行う (Infect. Immun. 81: 311, 2013)。この防御機構を免れた菌は休眠菌として

TDM や GMM の産生を抑制し、GroMM を産生することにより最低限の細胞壁構築を保っていると考えられる。その意味で、GroMM に対する自然免疫応答の存在が実証されたことは大変興味深い。

注目すべきは、GroMM に対する組織応答が好酸球優位であり、TH2 サイトカイン応答を伴っている可能性が高いことである。休眠菌は Mincle リガンドである GroMM を産生し、菌周囲に TH2 サイトカイン優位の微小環境を作り出すことにより、菌の長期生存が可能となることが考えられる。もしこれが事実であれば、GroMM と Mincle の相互作用を阻害することにより休眠菌が制御できる可能性も考えられる。

ヒトとマウスの慢性結核病態が大きく異なることは古くからよく知られている。本研究で明らかになったヒト Mincle とマウス Mincle の認識機構の違いは、GroMM が休眠菌マーカー脂質であることを考慮すると、両者の病態の差異を説明する切り口になると考えられる。今後ヒト Mincle トランスジェニックマウスにおける結核感染病態の解明が重要となろう。

E. 結論

結核休眠菌特有の細胞壁脂質である GroMM を認識する自然免疫受容体としてヒト Mincle を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita, D., Miyamoto, A., Hattori, Y., Komori, T., Nakamura, T., Igarashi, T., Harashima, H., **Sugita, M.** 2013. Th1-skewed tissue responses to a mycolyl glycolipid in mycobacteria-infected rhesus macaques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 108-13.

2. 学会発表

1. **杉田昌彦** . 2013 . CD1 と獲得免疫 . 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . (東京、11 月).

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

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

休眠期結核菌由来抗原に対するヒトの免疫応答

研究分担者 小出 幸夫（浜松医科大学）

研究要旨

Mycobacterium tuberculosis (結核菌)は細胞内寄生性細菌であり、貪食したマクロファージ内で増殖することができる。結核菌の細胞内増殖能はファゴソームとリソソームの融合(ファゴリソソーム形成)を阻害することによって獲得している。結核菌感染マクロファージにおけるファゴリソソーム形成阻害過程の詳細は明らかになりつつある。近年、結核菌の細胞内増殖能を制御する宿主因子としてオートファジーが関与していることが明らかになっている。マクロファージにおける結核菌へのファゴリソソーム形成阻害過程やオートファジー誘導機構に関してよく研究されてるが、樹状細胞における結核菌ファゴソームの小胞輸送機構に関する知見はほとんどない。本研究において、樹状細胞に感染した結核菌へのオートファゴソーム形成機構についてイメージ解析によって明らかにした。

A. 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌である。結核菌は感染マクロファージ内においてファゴリソソーム形成を阻害することによって、増殖能を獲得している。我々はこれまでに、ファゴソーム成熟に機能する Rab GTPase が結核菌ファゴソームからかい離することによってファゴソーム成熟が阻害され、その結果、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成が阻害されることを明らかにした。結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成阻害機構として、ファゴソーム成熟に関与する Rab GTPase のかい離機構のほかに、アクチン結合性タンパク質である Coronin 1a によるファゴリソソーム形成阻害機構が示されている。すなわち、Coronin-1a ノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームとリソソームの融合が促進されて、その結果、結核菌の増殖は阻害されることが示されている。近年、マクロファージによる結核菌の殺菌機構として、オートファジーが注目

されている。オートファジーは、細胞が飢餓状態になった場合や損傷を受けたときに誘導される、細胞の恒常性維持に機能するタンパク質分解過程である。また、免疫機構において、抗原提示細胞が抗原を効率よく分解、提示するためにオートファジーを利用することが明らかになっている。特に自然免疫機構における感染細胞の細胞質に移行する細胞内寄生性細菌の排除にオートファジーが機能していることが明らかになっている。結核菌感染マクロファージにおけるオートファジー誘導もよく研究されている。わまた、我々も、結核菌ファゴリソソーム形成を阻害する Coronin-1a はオートファゴソーム形成の阻害にも関与して、結核菌の細胞内増殖を支持していることを示した。このように、結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送機構はよく研究されているが、結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構を含む、小胞輸送機構に関して、ほとんど知見はない。本研究では結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構をイメージ解

析によって明らかにした。

B. 研究方法

1. 樹状細胞株

樹状細胞株として、DC2.4 と JAWSII を用いて実験を行った。また、骨髄由来樹状細胞は骨髄細胞を GM-CSF で分化させることによって得た。

2. 蛍光顕微鏡法

結核菌 Erdman 株を感染させた樹状細胞をパラフォルムアルデヒドで固定した後、抗 LC3 抗体、抗 p62 抗体、抗ユビキチン抗体などで免疫染色を行った。細胞観察は LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム(横河電機)を用いて行った。

3. 遺伝子ノックダウン

樹状細胞の遺伝子ノックダウン実験は siRNA をトランスフェクションすることによって行った。

倫理面への配慮

本研究は臨床研究に該当するため、国の指針に準拠して浜松医科大学が定めた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」「医の倫理委員会」の規定に従い、当該委員会での承認を得た後に研究を行った。

C. 研究結果

1. 樹状細胞に感染した結核菌にオートファゴソーム形成が行われる

樹状細胞株 DC2.4 および JAWSII に結核菌を感染させると、感染 2 時間後は結核菌ファゴソームにはオートファゴソームマーカータンパク質である LC3 は局在しなかったが(約 10%)、感染 6 時間後には約 30%の結核菌ファゴソームに局在した。また、感染 24 時間後においても結核菌ファゴソームに LC3 が局在していた。電子顕微鏡によって結核菌感染樹状細胞の薄片切片を観察した結果、感染結核菌はオートファゴソーム形成が行われていることが明らかになった。また、骨髄由来樹状細胞に結核菌を感染させても、感染 96 時間後において、結核菌ファゴソームの約 10%に LC3 が局在することが明らかになった。

2. 樹状細胞結核菌ファゴソームには p62 が局在する

樹状細胞に局在するオートファジー関連タンパク質の局在を調べた。オートファジーアダプタータンパク質である p62 は LC3 局在結核菌ファゴソームに共局在した。また、LC3 もしくは p62 局在結核菌ファゴソームはポリユビキチン化されることが明らかになった。

次に、リソソームマーカータンパク質である LAMP1 と MHC クラス II 分子の局在を調べた。感染 6 時間後では LAMP1 も MHC クラス II 分子は p62 局在オートファゴソームには局在していなかったが、感染 24 時間後には LAMP1 局在、もしくは MHC クラス II 分子局在オートファゴソームは増加していた。以上の結果は、結核菌オートファゴソームの成熟によってオートファゴリソソーム形成が起こること、および、結核菌抗原の抗原提示がオートファゴソーム形成によって促進されることを示唆する。

3. p62 依存的に結核菌ファゴソームはポリユビキチン化される

結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構を明らかにするため、結核菌感染樹状細胞をオートファジー誘導阻害剤である 3-メチルアデニンで処理した。LC3 局在結核菌ファゴソームは減少したが、p62 局在もしくはポリユビキチン化された結核菌ファゴソームは減少しなかった。また、オートファジー関連遺伝子である Atg5 や Beclin1 ノックダウン樹状細胞においても、p62 局在もしくはポリユビキチン化された結核菌ファゴソームは減少しなかった。次に、p62 をノックダウンした結果、ポリユビキチン化された結核菌ファゴソーム数は減少した。以上の結果は、結核菌ファゴソームのポリユビキチン化は p62 依存的に起こることを示す。

4. Atg5 依存的に結核菌オートファゴソームとリソソームが融合する

電子顕微鏡観察によって、Atg5 ノックダウン樹状細胞に感染した結核菌にはオートファゴソーム形成が行われないことが明らかになった。Atg5 ノックダウン樹状細胞で

のユビキチン化された結核菌には LAMP1 や MHC クラス II 分子が局在しなかった。このことは、Atg5 依存的に結核菌オートファゴソームにリソソームが融合して、MHC クラス II 分子が結核菌オートファゴソームに局在することを示す。

D. 考察

これまでの研究では、結核菌感染マクロファージにおけるファゴリソソーム形成阻害機構やオートファゴソーム形成機構について研究されてきた。しかし、結核菌感染樹状細胞における小胞輸送機構についての知見はほとんどなかった。本研究において、はじめて結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構について明らかになった。また、MHC クラス II 分子が局在する結核菌オートファゴソームが増加することは、オートファゴソーム成熟によって抗原提示が促進される可能性を示唆する。結核菌はファゴリソソーム形成を阻害するため、樹状細胞による感染結核菌の抗原提示能は非常に低いといわれている。しかし、生体内では結核菌感染によって非常に強力な感作 T 細胞が形成されていることがツベルクリン反応やクオンティフェロン検査などによって示されている。これまでは、この「矛盾」はクロスプレゼンテーションによる抗原提示機構によって説明されてきた。本研究は、結核菌感染樹状細胞での p62 依存的オートファゴソーム形成による抗原提示機構が、この「矛盾」を説明できる可能性を示唆する。本研究成果は、樹状細胞における結核菌オートファゴソーム形成機構と抗原提示能の関係を明らかにすることによって、新しい結核治療薬、治療方法、診断検査法の開発に貢献する可能性を示す。さらに、本研究によって潜在性結核菌に対する免疫応答機構を説明する手がかりを得ることができた。

E. 結論

結核菌感染樹状細胞ではオートファジーアダプタータンパク質 p62 依存的にオートファゴソーム形成が行われ、オートファ

ジー関連タンパク質である Atg5 依存的にオートリソソーム形成が行われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、**小出幸夫**. 2013. 結核菌の細胞内寄生戦略. 医学のあゆみ. 246: 474-478.
2. Hozumi H, Tsujimura K, Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Nagata T, Miwa S, Hayakawa H, Fujisawa T, Hashimoto D, Inui N, Suda T, Chida K, **Koide Y**. 2013. Immunogenicity of dormancy-related antigens in individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. Int J Tuberc Lung Dis. 17:818-824.
3. Seto S, Tsujimura K, Horii T, **Koide Y**. 2013. Mycobacterial survival in macrophages in the lung as a result of Coronin-1a inhibition of autophagosome formation. In AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection. Hyatt MA. edited. Elsevier. 161-170.
4. Seto S, Sugaya K, Nagata T, Horii T, **Koide Y**. 2013. Rab39a interacts with phosphatidylinositol 3-kinase and negatively regulates autophagy induced by lipopolysaccharide stimulation in macrophages. PLoS One. 8:e83324.
5. Seto S, Tsujimura K, Horii T, **Koide Y**. 2013. Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in dendritic cells. PLoS One.8: e86017.

2. 学会発表 特になし

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

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

持続潜伏性肺非結核性抗酸菌症（MAC 症）の新規血清診断法の開発

研究分担者 前倉 亮治（国立病院機構・刀根山病院）

研究協力者 北田 清悟（国立病院機構・刀根山病院）

研究要旨

(1)肺 MAC 症診断に対するキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性を、多数例を用いて再検証した。肺 MAC 症 485 例、肺結核 133 例、肺カンサシ症 23 名、健常コントロール 265 名を対象に検討した。感度は 78.6%特異度 96.9%であり、従来 of 報告と同様の結果が得られ、補助診断としての有用性が確認された。

(2) 結核菌接触感染の危険が高い結核病棟に勤務する医師および看護師の内、1 年以内に QFT が陽転化した 13 例を早期潜在感染(Recent LTBI)例とし、休眠菌と増殖菌に由来する各種抗原に対する抗体価を測定した。休眠菌感染由来の抗体価は他の職員に比して有意に上昇しており、両関連抗体は有意な正の相関関係を示した。接触感染による結核菌潜在感染も、休眠菌と増殖菌が共存した状態で感染しているものと考えられた。このうち 1 例が発病し、この抗体価は 95%確立楕円外に増殖菌関連抗体価が陽性方向に大きく外れた症例であった。結核菌の休眠菌(MDP1,Acr)と増殖菌(CFP10,ESAT6,Ag85A)感染に由来する抗原を使って、潜在感染から発病の危険性が高い前発病状態を正確に診断出来るキットを作成できる

A. 研究目的

- 1) 肺 MAC 症の血清診断検査キット(キャピリア MAC 抗体 ELISA)の開発し、保険収載されたのでこの検査法の臨床的意義と位置づけを明らかにする
- 2) 結核菌の休眠菌感染と増殖菌感染を検出する抗体を同定できたので、これを用いて結核の前発病状態を正確に診断できる血清診断法を確立する。

体価を測定した。

倫理面への配慮

本研究は、国立病院機構刀根山病院の臨床研究倫理審査委員会において審議され、承認された。

B. 研究方法

- 1) 肺 MAC 症診断に対するキャピリア MAC 抗体 ELISA の有用性を、多数例を用いて再検証した。
- 2) 結核菌接触感染の危険が高い結核病棟に勤務する医師および看護師の内、1 年以内に QFT が陽転化した 13 例を早期潜在感染(Recent LTBI)例とし、休眠菌と増殖菌に由来する各種抗原に対する抗

C. 研究結果

- 1) 肺 MAC 症 485 例、肺結核 133 例、肺カンサシ症 23 名、健常コントロール 265 名を対象に検討した。感度は 78.6%特異度 96.9%であり、従来 of 報告と同様の結果が得られ、補助診断としての有用性が確認された。
- 2) 休眠菌感染由来の抗体価は他の職員に比して有意に上昇しており、両関連抗体は有意な正の相関関係を示した。接触感染による結核菌潜在感染も、休眠菌と増殖菌が共存した状態で感染して

いるものと考えられた。このうち 1 例が発病し、この抗体価は 95% 確立楕円外に増殖菌関連抗体価が陽性方向に大きく外れた症例であった。

D. 考察

- 1) MAC 抗体価が、治療開始や治療終了の指標となるかどうかの検討。抗体価が高ければ、高いほど予後不良ということが示すことができれば、抗体価が高い症例には積極的に治療を行う根拠となる。同時に、低値になれば予後良好ということを示せば治療終了の指標とすることができる。
- 2) 結核菌の休眠菌(MDP1,Acr)と増殖菌(CFP10,ESAT6,Ag85A)感染に由来する抗原を使って、潜在感染から発病の危険が高い前発病状態を正確に診断出来るキットを作成する。今回は単施設での成績であるので、多施設での検討が必要になる。

E. 結論

- 1) キャピリア MAC 抗体 ELISA 検査を非結核性抗酸菌症の診断・治療ガイドラインに反映することができる。
- 2) 結核のより明確な予防内服基準を作成することができる。

G. 研究発表

1. **論文発表** 特になし
2. **学会発表**

1. **Seigo Kitada**, Kenji Yoshimura, Keisuke Miki, Mari Miki, Masahide Mori and **Ryoji Maekura**. 2013. Utility of a serodiagnostic kit for diagnosing Mycobacterium avium complex pulmonary disease in Japan The 44th Union World Conference on Lung

Health(Paris France 、10 月)

2. **北田清悟、前倉亮治**、藤川健弥 .2013 . 肺 MAC 症診断におけるキャピリア®MAC 抗体 ELISA の臨床的有用性 .第 88 回日本結核病学会総会(千葉、3 月).

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

