

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

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	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	仁木 誠	(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	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	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 清悟	(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。休眠菌は薬剤抵抗性であることから、結核の治療を困難にしている。本研究で我々はまず、主力結核薬であるイソニアジド抵抗性が静止期以降の抗酸菌で生じる分子メカニズムを明らかにした。潜在期に発現が増強される、Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が、イソニアジドの活性化に必須な酵素の発現を抑制することから生じることを示した。解析してきた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。さらに本研究では、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 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を示した。

A. 研究目的

TDMは抗酸菌細胞壁表層に多量に存在する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。

我々はまず、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らかにした。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らかにしたが、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。その結果、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を示した。

B. 研究方法

速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155株 (WT)およびそれを親株としたMDP1欠失株 (KO)ならびに補填株 (Comp)については、LB液体培地にてOD₆₀₀=0.1相当に調製した。その後、各種抗菌薬を添加したLB培地に菌液を接種し37°Cで48時間培養した。培養後、LB寒天培地に接種し、CFUを算出して薬剤非添加で培養した際のCFUと比較した。

M. smegmatis WT株およびKO株菌体はTrizolで懸濁したのち機械的に破碎し、Total RNAを抽出し、マイクロアレイ解析およびリアルタイムRT-PCR解析を行った。マイクロアレイはロシュ・ダイアグノスティック株式会社によるカスタムアレイを使用した。ハイブリダイゼーション装置はMAUI (BioMicro社)を、解析装置はGenePix 4000B (Axon社)、シグナル解析はNimbleScan ver2.3 (Nimblegen社)を用いて行った。得られたデータの解析はGeneSpring (アジレント・テクノロジー株式会社)により行った。抽出

した各菌株の RNA からの逆転写反応には High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いた。SYBR Green によるリアルタイム PCR 解析は ABI 7500 Fast (Applied Biosystems)により行った。

各菌株菌体は PBS およびガラスビーズと混合したのち Mini Bead-beater にて破碎し、遠心後の上清を回収した。得られた抽出蛋白質は SDS 含有 12%ポリアクリルアミドゲルにて分離後 PVDF メンブレンに転写した。MDP1 および KatG の検出には、抗 MDP1 マウスモノクローナル抗体および抗 KatG ウサギポリクローナル抗体を用いた。

Native PAGE および Nitroblue tetrazolium を用いた活性染色 INH はカタラーゼ活性を有する抗酸菌蛋白質 KatG により活性化される際、活性酸素を生じることが知られている。この性質を利用し、活性酸素による Nitroblue tetrazolium (NBT)の還元により生じたホルマザンの精製による活性染色を行った。まず、3 で得られた抽出蛋白質を未変性状態で 12%ポリアクリルアミドゲルにより分離後、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に浸漬した。その後 INH、Nitroblue tetrazolium および H₂O₂を添加し、室温で 30 分震盪した。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 µg/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 5~0.5µg/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

M. smegmatis WT, KO, Comp 株において、各種抗生剤に対する感受性を比較した。その結果、RFP, LVFX, EB に対する感受性はすべての株において差が認められなかった。これに対し、INH に対する感受性は MDP1 欠失により増強することがわかった。INH 耐性については、そのメカニズムからいくつかの遺伝子の関与がすでに報告されているため、マイクロアレイ解析によりこれらの遺伝子の発現の変化を MDP1 の有無で比

較した。その結果、イソニコチン酸アシルと NADH をカップリングし、INH を活性型に変化させるカタラーゼをコードする遺伝子 *katG* の発現が MDP1 欠失により有意に増強することがわかった。リアルタイム RT-PCR の結果からも、MDP1 欠失により *katG* の発現が 2 倍程度増強することが確認された。以上のことから、MDP1 が *katG* の転写を抑制し、INH が活性型に転じるのを抑制することにより薬剤抵抗性を獲得している可能性が示唆された。

実際に MDP1 の有無により KatG 蛋白質の発現量に変化があるかを検討するために、抗 KatG 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、MDP1 KO 株においては KatG の発現増強が認められた。次に、KatG の発現増強により INH の活性化が促進されることを確認するために、NBT を基質とした活性染色を行った。その結果、MDP1 KO 株においては他の 2 株と比較して INH 依存的な活性酸素産生による NBT の還元が促進されることが明らかになった。以上より、MDP1 欠失により KatG の発現が増強し、それに伴い菌体内での INH 活性化が亢進することにより感受性が増強することがわかった。

MDP1 の発現は経時的に増強し、それに伴い KatG の発現が減弱することにより表現型のみ薬剤抵抗性が生じる。

これまでの研究により、MDP1 は定常期以降に発現が上昇することがわかっている。そこで、MDP1 の経時的な発現の変化が KatG の発現および菌の INH 感受性に影響を与えるかを *M. smegmatis* WT 株を用いて検討した。ウエスタンブロット解析により、対数増殖期と定常期の菌体における MDP1 および KatG の発現の変化を観察したところ、MDP1 が経時的に発現増強するのに反比例し、KatG の発現は経時的に減弱することが明らかになった。同様に、増殖期および定常期の菌体を用いて INH 感受性を比較したところ、定常期の菌体はより INH 抵抗性であることが確認された。以上のことから、定常期における INH 抵抗性は MDP1 の発現

増加により KatG 発現が抑制されることにより起こることが明らかになった。

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制能を有する 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

MDP1 は抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質であり、結核菌を含む抗酸菌群において広く保存されている。クロマチン結合蛋白質は菌の染色体構造の維持に関与し、同時に転写や翻訳を制御することが知られていることから、MDP1 も転写因子の一つとして機能していると考えられている。本研究で我々は、MDP1 が INH の活性化に関与する酵素である KatG の発現を制御していることを明らかにした。KatG はカタラーゼ活性を有し、活性酸素である過酸化水素を分解し水と酸素を生じることから、結核菌が宿主内において酸化ストレスを受ける際に抗酸

化物質として働き、菌の生存を助けると考えられている。我々のこれまでの研究から、MDP1 もフェロキシダーゼ活性により鉄存在下で過酸化水素を水に変換することが明らかになっている。つまり両蛋白質は、過酸化水素の消去において同様の機能を有する。そのために、KatG と MDP1 の発現は相反して調節されているのではないかと推察される。実際に *M. smegmatis* 野生株において、KatG と MDP1 発現量は相反して調節されており、それが定常期以降の INH 抵抗性をもたらしたのではと考えられる。

MDP1 は、細菌の増殖を抑制する活性があり、静止期や休眠期において発現が増強するとの報告がある。MDP1 の結核菌における発現調節機構は不明であるが、本研究の結果から、ヒト型結核菌においても MDP1 が KatG の発現調節を介して、特に定常期以降の INH 抵抗性に関わる可能性が示唆される。これまでの研究により、MDP1 欠失により休眠期の遺伝子発現に顕著な抑制が観察されることから、この分子による代謝調節が潜伏感染菌の薬剤抵抗性に関与していると考えられている。現行の抗結核薬は増殖期の代謝に関わる分子をターゲットとしたものであり、休眠菌には無効であることが問題となっていた。休眠菌に有効な新規薬剤の開発には休眠期特異的な代謝に関与する分子の同定が必須であると考えられることから、MDP1 の発現により転写の調節が行われる分子を明らかにすることで、休眠期特異的な新規薬剤標的分子の同定が期待される。

結核発症ハイリスク群の診断法の開発をめざし、さらに我々は、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 は上述のように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、システミックに、①より多くのポピュレーションで検討を行う、②T 細胞応答との比較検討、③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

MDP1 は定常期以降の結核菌の表現型であるイソニアジド抵抗性の獲得に関与することを明らかにした。また、その抵抗性はイソニアジド活性化を担う分子である KatG の発現抑制によることを明らかにした (Niki et al, J Bio Chem, 2012)。

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を示した (Osada-Oka et al Microbiol Immunol, 2013)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takatsuka, M., **M. Osada-Oka**, E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, **M. Niki**, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto**. 2011. A Histone-Like Protein of Mycobacteria Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity and Protects against DNA Damage by Fenton Reaction. PLoS One 6:e20985.
2. **Ozeki, Y., Y. Hirayama**, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Vaccine 29:6881-6887.
3. Kasahara, E., A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E. F. Sato, **S. Matsumoto**, H. Okamura, and M. Inoue. 2011. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett 585:2263-2268.
4. Tateishi, Y., **S. Kitada**, K. Miki, **R. Maekura**, Y. Ogura, **Y. Ozeki**, Y. Nishiuchi, **M. Niki**, T. Hayashi, K. Hirata, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2012. Whole-Genome Sequence of the Hypervirulent Clinical Strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. J Bacteriol 194:6336.
5. Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, **Y. Wang**, M. Inoue, R. Kawahara, **R. Maekura**, **Y. Ozeki**, H. Ogura, **K. Kobayashi**, Y. Suzuki, and **S. Matsumoto**. 2012. Dominant Incidence of Multidrug and Extensively Drug-Resistant Specific *Mycobacterium tuberculosis* Clones in Osaka Prefecture, Japan. PLoS One 7:e42505.
6. **Niki, M., M. Niki**, Y. Tateishi, **Y. Ozeki**, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and **S. Matsumoto**. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J Biol Chem 287:27743-27752.
7. Fujii, J., M. Naito, T. Yutsudo, **S. Matsumoto**, D. P. Heatherly, T. Yamada, H. Kobayashi, S. Yoshida, and T. Obrig. 2012.

- Protection by a Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Vaccine Expressing Shiga Toxin 2 B Subunit against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Mice. Clin Vaccine Immunol 19:1932-1937.
8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
- 総説
1. Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.
 2. 仁木満美子、仁木 誠、尾関百合子、岡真優子、松本壮吉. 2011. 結核研究の新たな展開—潜在性結核と結核菌：休眠現象の分子メカニズム—、最新医学、Vol66 3号、P149-155.
 3. 松本壮吉、尾関百合子、小林和夫. 2012. 新しい結核ワクチン開発の展望。臨床と微生物、Vol39 2号、P131-136.
 4. 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.
 5. 松本壮吉. 2013. 潜在性結核と結核菌の潜伏感染メカニズム、医学のあゆみ、246、470-473.
 6. 松本壮吉. 2013. 抗酸菌の休眠現象や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム、Jpn. J. Lepr、82、119-122.
 7. 松本壮吉. 2014. 結核とその制圧を目指した研究、766、2-7.
- 著書
1. 西内由紀子、立石善隆、山田毅、松本壮吉. 2011. 人獣共通感染症、木村 哲、喜田 宏 編集、非結核性抗酸菌症

- 改訂版、医薬ジャーナル社、337-342.
2. **Niki M** and **Matsumoto S**. 2011. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 215-238.
 3. 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. 松本壮吉. 2011. 潜在性結核の分子機構と結核制圧研究. 第 28 回日本医学会総会 (東京、4 月).
 2. 立石善隆、北田清悟、前倉亮治、松本壮吉. 2011. 結核血清診断の進歩. 第 86 回日本結核病学会総会 (6 月、東京).
 3. 森田康裕、松本壮吉、小林和夫、木下タロウ. 2011. マンナン生合成の異常は結核菌細胞壁のバリア機能を弱め、結核菌を β ラクタム系薬剤感受性にする. 第 86 回日本結核病学会総会 (東京、6 月).
 4. 仁木誠、仁木満美子、松本壮吉. 2011. 抗酸菌の薬剤感受性におけるヒストン様蛋白質の機能解析. 第 86 回日本結核病学会総会 (東京、6 月).
 5. 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、前倉亮治. 2011. 環境から分離した *Mycobacterium avium* のバイオフィルム. 第 86 回日本結核病学会総会 (東京、6 月).
 6. **Sohkichi Matsumoto**. 2011. HOST FACTORS HAVING AN IMPACT ON THE GROWTH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9 月).
 7. Yukiko Nishiuchi, **Sohkichi Matsumoto**, Yoshitaka Tateishi, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu. 2011. BIOFILM FORMATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* ISOLATED FROM LIVING ENVIRONMENT. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9 月).
 8. Jun-Ichi Maeyama, Sumiko Iho, **Mayuko Osada-Oka**, **Sohkichi Matsumoto**, Masanori Isaka, Saburo Yamamoto. 2011. IMMUNE RESPONSES IN GUINEA PIG ADMINISTERED WITH ANTI-TUBERCULOSIS BOOSTER VACCINE CANDIDATE International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9 月).
 9. **Yuriko Ozeki**, **Kazuo Kobayashi**, **Sohkichi Matsumoto**. 2011. THE EFFICACY OF BCG MAY BE A TIME-DEPENDENT AFTER THE VACCINATION AND AGE-INDEPENDENT IN MICE. International Union Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9 月).
 10. 岡真優子、松本壮吉、岩尾 洋. 2011. 結核菌感染による肺肉芽形成と低酸素応答転写因子の活性化. 第 15 回酸素ダイナミクス研究会 (佐賀、9 月).
 11. 松本壮吉、小林和夫. 2011. 結核菌の休眠現象と潜在性結核. 第 84 回日本生化学会 (京都、9 月).
 12. 松本壮吉. 2011. 結核菌がゆっくりと長く生きるメカニズムと結核の制圧を目指した研究. 第 52 回日本熱帯医学会大会・第 26 回日本国際保健医療学会学術大会 (東京、11 月).
 13. 松本壮吉. 2011. 結核菌の増殖制御機構と結核制圧戦略. 第 7 回霊長類医科学フォーラム (茨城、11 月).
 14. **Yuriko Ozeki**, **Yukio Hirayama**, **Osada-Oka mayuko**, Takemasa Takii, Saburo Yamamoto, **Kazuo Kobayashi**, and **Sohkichi Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会 (大阪、11 月).
 15. 岡真優子、合田亘人、曾我朋義、尾関百合子、小林和夫、松本壮吉、岩尾洋.

2011. マクロファージ内結核菌増殖における宿主グルコース代謝の重要性. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会 (大阪、11 月).
16. 松本壮吉. 2012. 結核菌の休眠現象と潜在性結核診断の可能性. 第 2 回結核感染診断研究会 (広島、5 月).
 17. 仁木満美子、松本壮吉. 2012. 定常期抗酸菌にみられるイソニアジド抵抗性獲得メカニズムの解析. 第 82 回実験結核研究会 (広島、5 月).
 18. 西内由紀子, 戸谷孝洋, 立石善隆, 前倉亮治, 松本壮吉. 2012. 非結核性抗酸菌が形成するバイオフィルムの生態学的特徴. 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 (大阪、7 月).
 19. 松本壮吉. 2012. 結核菌の増殖、長期生存、および静止期以降の薬剤抵抗性獲得の分子メカニズム. 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 (大阪、7 月).
 20. 松本壮吉. 2012. 休止期結核菌の性状と、休止期抗原を利用した結核菌感染検出の試み. 第 44 回関西抗酸菌研究会 (大阪、8 月).
 21. Nishiuchi Y., S. Kitada, S. Matsumoto, and R. Maekura. 2012. Recovery and genetic polymorphism of Mycobacterium avium complex (MAC) in the Bathroom. Tuberculosis 2012. (Paris, France、9 月).
 22. Inoue M., S. Nagi, E. Faith, M. Osada-Oka, K. Ono, Y. Ozeki, M. Niki, K. Kobayashi, M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, Y. Ichinose, S. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 第 53 回日本熱帯医学会大会 (北海道、9 月).
 23. Matsumoto S. 2012. Functions of mycobacterial DNA binding protein and its contribution to the persistent infection of Mycobacterium tuberculosis. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. (Buyeo, Korea、9 月).
 24. 前山順一, 伊保澄子, 岡真優子, 松本壮吉, 山本 郎. 2012. 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質およびアジュバントの評価. 16 回日本ワクチン学会学術集会 (神奈川、11 月).
 25. 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、5 月).
 26. 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).
 27. 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).
 28. 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).
 29. 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).
 30. 戸田彩季、瀬戸俊之、時政定雄、新宅治夫、松本壮吉. 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).
 31. 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).
 32. 岡真優子、立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、前倉亮次、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).

33. 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 |

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）。BCG を接種したモルモットやアカゲザルの研究から、宿主はこの GMM を標的とした CD1 依存的 T 細胞応答を惹起することが明らかとなった。この応答は TH1 サイトカインやケモカイン産生を伴っており、感染防御の重要な役割を果たすと考えられる。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。BCG 感作モルモットに GroMM を接種すると、好酸球浸潤を伴った遅延型応答を認めた。興味深いことに、未感作個体においても程度は弱いながらも GroMM に対する好酸球性炎症を認めた。このことから、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 cell wall skeleton 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。トレハロースジミコール酸（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 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。

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グルコースモノミコール酸（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。

このような学術的背景と新展開を鑑み、生体内増殖菌のマーカー脂質である GMM と休眠菌のマーカー脂質である GroMM に対する免疫応答機構を明らかにすることを目的として本研究を推進した。

B. 研究方法

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。また、実験目的に応じて液体培地にグルコースあるいはグリセロールを添加した。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、GMM あるいは 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。GMM あるいは 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。

アカゲザルの免疫：BCG 1×10^8 cfu を皮内接種することにより免疫を行った。GMM リ

ポソームおよび GroMM リポソームの皮内接種には、50 μ g を用いた。

IFN- γ ELISPOT 法：ヒト・サル IFN- γ ELISPOT キット (Mabtech) を用い、指示書にしたがって行った。

フローサイトメトリー：アカゲザル末梢血単核球を抗原存在下で 6 時間刺激し、さらに brefeldin A を加えて 6 時間培養した。細胞を抗 CD8 抗体 (PE-Cy7) と抗 CD4 抗体 (eFluor 450) で標識したのち、固定と透過処理を行った。引き続き、抗 IFN- γ 抗体 (PE) と抗 TNF- α 抗体 (FITC) による標識を行い、BD FACS CantoII を用いて解析した。

リアルタイム PCR：サル皮膚組織 (100mg) を Micro Smash (トミー) とステンレスビーズ (直径 5mm) を用いて破砕したのち、RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出した。続いて、トータル RNA (1 μ g) より常法にしたがい cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として各遺伝子の mRNA 発現量を Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて定量した。変性処理 (95°C、60 秒) ののち、変性 (95°C、15 秒)、伸長 (60°C、35 秒) の 2 ステップ PCR (40 サイクル) を行った (Applied Biosystems 7500)。用いた各プライマーの配列は下記の通りである。

IFN- γ : GAC ATC TTG AGG AAT TGG AAA G (sense), TTT GGA TCC TCT GGT CAT CTT (antisense); IL-4 : AGC TGA TCC GAT TCC TGA AA (sense), GCT GGC TTC CTT CAC AGG AC (antisense); IL-10 : TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA (sense), GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA (antisense); eotaxin 1 : GGG CTC ACT GGG CCA GAT TC (sense), TCT CCA GTC GCT GAA GGG GT (antisense); granulysin : TCG ACT GCA AGA TCT GTC TGA G (sense), ACT TCA CCA TCC TAC ACA CAC G (antisense); perforin : GAG TGC CGC TTC TAC AGT TAC CA (sense), CAG CCC GGA TGA AGT GGG TG (antisense); GAPDH : GAA GCC CCA TCA CCA TCT TCC AGG (sense), GAG CCC CAG CCT TCT CCG TG (antisense)。

養子移入 (adoptive transfer) : GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、37°C 10 分間 CFSE に

よる標識を行った。T 細胞株を樹立したのと同じのアカゲザル個体の皮膚に BCG を接種するとともに、CFSE 標識 T 細胞 1×10^7 を静脈注射した。4 日後に皮膚を切除したのち、固定を行い、免疫組織化学的解析を行った。

モルモット皮内テスト：3 週齢のメス Hartley モルモットは、日本 SLC より購入し、SPF 環境下で飼育した。BCG (5×10^7 cfu) を皮内投与し、6 週後に精製 GroMM ($5 \mu\text{g}$) 含有リポソームおよびコントロールリポソームを $100 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁して皮内接種した。皮膚反応を経時的に観察し、硬結径を測定した。

サイトカイン mRNA 発現解析：BCG 免疫モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、GMM リポソーム ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) あるいは空リポソームの存在下で培養した。18 時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータル RNA を単離した。さらに oligo(dT)を用いた常法 (J Biol Chem 286: 16800, 2011) に従い、逆転写反応を行い、鋳型となる一本鎖 DNA を作成した。RT-PCR に用いたプライマーは下記の通りである。IFN- γ : 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3' (sense)、5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3' (anti-sense) ; IL-5 : 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3' (sense) 、5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3' (anti-sense) ; IL-10 : 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3' (sense) and 5' -TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3' (anti-sense) 。

Mincle シグナルレポーター細胞：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で、ヒト Mincle のみを発現したマウス系統を樹立した。

組織化学：皮内接種を受けた動物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。アカゲザル動物実験にあたっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守し行った。アカゲザルの使用については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。加えて、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守して、研究を行った。なお、本研究において、ヒトから提供を受けた組織・細胞等の試料は使用していない。

C. 研究結果

GMM に対するアカゲザル免疫応答：BCG 接種アカゲザル末梢血単核球を用いた

IFN- γ ELISPOT 法において、GMM 特異的 T 細胞の存在を容易に検出することができた。そこで末梢血単核球を *in vitro* において GMM で刺激したのち、フローサイトメトリーにより T 細胞マーカー分子の発現やサイトカイン産生を検証したところ、GMM 特異的 T 細胞は CD4 陽性ポピュレーションや CD8 陽性ポピュレーションにわたって広く存在すること、またそのほとんどは IFN- γ と TNF- α を同時に産生した。

BCG 接種アカゲザルの皮膚に GMM を皮内接種すると局所に炎症応答が誘起され、組織染色により単核球の顕著な浸潤を観察した。皮膚組織より RNA を抽出しリアルタイム PCR 法によるサイトカイン応答の検証を行ったところ、IFN- γ の顕著な発現亢進を認め、IL-4 や IL-10 の発現はむしろ低下していた。また、細胞傷害性 T 細胞因子である granulysin や perforin の発現上昇を認めた。

アカゲザル個体より CD1c 拘束性 GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、それを CFSE で標識したのち同一個体静脈中に adoptive transfer を行ったところ、BCG 接種局所に形成された肉芽腫様組織内に浸潤することがわかった。また肉芽腫を形成するマクロファージは CD1c 分子を強発現することを免疫組織化学法により確認した。

培地へのグリセロール添加により GroMM の産生誘導ができる : BCG を標準 7H9 培地中で培養しても、GroMM は検出されない。しかし、2~10% のグリセロールを添加した 7H9 培地を用いて BCG を培養し、菌体から脂質を抽出して TLC 解析を行ったところ、グリセロール濃度依存的に GroMM と同一の Rf 値を有する脂質分子種の産生誘導を認めた。このスポットを精製し、マススペクトロメトリーによる解析を行ったところ、C84:1 ケトミコール酸を含有した GroMM や他のサブクラス、鎖長のミコール酸を含有した GroMM の存在が確認された。したがって、酵素反応の詳細は不明ながら、BCG は外来性のグリセロールを利用して GroMM を産生することができることが実証された。

モルモットにおいて GroMM は好酸球の浸潤を主体とした皮膚アレルギー応答を誘起する : 2% グリセロール存在下で培養した BCG をモルモットに接種し、6 週後に GroMM リポソームを皮内投与したところ、数時間は皮内反応を認めなかったが、12 時間後には顕著な発赤、腫脹、硬結を認めた。この応答は 36 時間から 48 時間をピークとし、その後消退傾向を示した。このような反応は、空リポソームの皮内投与ではまったく観察されなかった。一方、未感作モルモットに GroMM を皮内投与すると、36 時間後よりわずかな硬結の形成を認めた。この応答は、空リポソームでは観察されなかった。以上の結果から、GroMM に対する生体応答は未感作個体においても生じるが、感作によりその応答が増強されることが明らかとなった。

GroMM の生体応答の質を評価するため、感作モルモットの GroMM 接種部位より皮膚組織を採取し、組織化学解析を行った。その結果、多くの多型核球の浸潤を認め、そのほとんどは好酸球であった。また顕著ではないが、有意な単核球浸潤も認めた。これらの変化は、空リポソーム投与部位ではまったく認めなかった。また未感作モルモットの GroMM 接種部位に対して同様の組織化学解析を行ったところ、感作モルモットより顕著ではないものの、好酸球浸潤を認めた。

GroMM に対するアレルギー応答は、TH2 型サイトカイン産生にシフトした応答である : BCG 接種モルモットの所属リンパ節を GroMM リポソームあるいは空リポソームで刺激し、TH1 型サイトカインである IFN- γ 、TH2 型サイトカインである IL-5 と IL-10 の転写を RT-PCR により検証したところ、IFN- γ の転写は空リポソーム刺激でも検出され、GroMM リポソーム刺激でむしろ減弱していた。一方、IL-5 と IL-10 の転写は空リポソーム刺激でまったく誘導されないのに対し、GroMM リポソーム刺激により顕著に誘導された。以上の結果から、GroMM に対するアレルギー応答は、TH2 型サイトカ

イン応答にシフトした反応であり、それと連関して好酸球の局所浸潤が起きる可能性が考えられた。

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り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りポーター細胞は、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

本研究で得られたアカゲザルおよびモルモットの解析成果は、高等動物の免疫系と細胞内寄生細菌である結核菌の長期にわたる相克と共生の結果として醸成された適応戦略の一端を如実に示している。グルコースがほとんど存在しない生体外環境において抗酸菌は TDM を産生するが、生体内においては高濃度に存在する宿主由来グルコースを競合的基質として用いることにより、アジュバント作用の強い TDM の産生を抑

制し、アジュバント作用が微弱な GMM を代替的に産生する。これによって菌は宿主自然免疫系から巧みにエスケープする。しかしこの糖脂質変換は新たな獲得免疫標的抗原の生成をもたらし、GMM 特異的 CD1 拘束性 T 細胞応答が惹起される（ヒトでは CD1b 分子、アカゲザルでは CD1c 分子が働く）。この応答は、ツベルクリン応答などこれまで知られている結核菌抗原特異的応答と比して極めて TH1 型サイトカイン産生にシフトしたものであり、菌の制御に働くと考えられる。加えて、本研究では初めて、GMM 特異的 T 細胞が感染局所に形成された肉芽腫様組織に深く浸潤することを示した。局所では GMM の新生とマクロファージの CD1 発現が起きていることから、浸潤した GMM 特異的 T 細胞は高度に活性化し、IFN- γ や TNF- α を産生することにより感染防御に大きく貢献することが考えられる。さらに GMM 接種部位では granulysin など菌の直接の制御に働く殺菌因子の産生も亢進することから、サイトカイン経路とは異なる感染防御機構の存在も推察される。以上の観察と GMM 特異的 T 細胞応答がメモリー応答であることを考えると、GMM が脂質をベースとした新しいタイプの抗結核ワクチンとして機能する可能性が高まる。実際、研究分担者は適切なアジュバントとともに GMM を接種することによりアカゲザルに GMM 特異的応答を誘導することに成功しており、脂質サブユニットワクチン開発の手がかりが得られつつある。

一方、潜伏感染において休眠結核菌は、低代謝あるいは特異的な発現制御機構を介して TDM と GMM 両方の産生を抑制し、TDM による自然免疫、GMM による獲得免疫から免れている。結核潜伏感染と深く関連したミコール酸含有脂質として報告

(Chem Biol 16: 82, 2009) された GroMM は、おそらく TDM と GMM の低下に対して代償的に機能し、細胞壁構築の維持に寄与するものと考えられる。したがって、GroMM に対する生体応答の研究は、潜伏感染病態の理解と制御に極めて重要である。BCG 免

疫アカゲザルに GroMM を皮内接種すると、GMM に対する応答とは異質の応答が観察された。すなわち TH2 サイトカイン応答が主体となり、TH1 サイトカイン応答は顕著に抑制されていた。このことは、休眠菌による GroMM 産生が合目的な菌側応答であり、微小環境を TH2 優位にすることにより TH1 サイトカイン応答による制御を長期に回避する手段として捉えることができる。

本研究ではさらに、ヒト Mincle が GroMM の自然免疫受容体であることを明らかにした。分子機序が解明できたことにより、潜伏感染病態の理解が飛躍的に進むだけでなく、潜伏感染の制御に向けた新たなストラテジーを構築することができると期待される。

E. 結論

宿主内増殖菌特異的脂質 GMM と休眠菌特異的脂質 GroMM に対する応答を、モルモットおよびアカゲザルモデルを用いて検証した。その結果、前者は TH1 サイトカイン応答を誘起するのに対し、後者は TH2 サイトカイン応答を誘起することが明らかとなった。すなわち GroMM 産生は、休眠菌が TH1 サイトカインによる制御を回避するための長期生存手段と考えられた。さらに GroMM の宿主受容体を同定した。これにより潜伏感染病態を分子論的に解明することが可能となった。とりわけ本研究で樹立したヒト Mincle トランスジェニックマウスは今後の解析に貴重な動物モデルとなることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori, Y., I. Matsunaga, T. Komori, T. Urakawa, T. Nakamura, N. Fujiwara, K. Hiromatsu, H. Harashima, and M. Sugita. 2011. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 409: 304-307.
2. Morita, D., Y. Hattori, T. Nakamura, T. Igarashi, H. Harashima, and M. Sugita.

2013. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. *Infect. Immun.* 81: 311-316.

3. 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. Sugita M. 2011. Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. 2011. The 6th International Symposium of Institute Network. (東京、6月).
2. Sugita, M., D. Morita, and T. Igarashi. 2012. Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. (Seoul, Korea、8月).
3. 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

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・理事）

研究要旨

休眠期の *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) を標的として、再燃を制御できるワクチン開発を目指して、その標的抗原の探索を行った。また、樹状細胞による結核菌抗原のヘルパーT細胞への抗原提示機構の解明を目指して、結核菌感染樹状細胞におけるオートファジー誘導機構について明らかにした。休眠期結核菌が発現する遺伝子群である DosR レギュロンタンパク質に対する T 細胞応答を調べた結果、結核患者もしくは潜伏感染者において強く反応する抗原を 12 種類同定することができた。結核菌感染樹状細胞におけるオートファジー誘導機構を調べた結果、オートファジーアダプタータンパク質である p62 依存的に結核菌オートファゴソームが形成されて、抗原提示分子である MHC クラス II 分子が局在することが明らかになった。

A. 研究目的

乳幼児粟粒結核などの一次結核に対する BCG の効果は広く認められているが、潜伏感染した結核菌による再燃（二次結核）に対するその効果は疑問視されている。成人肺結核の大部分が内因性再燃であり、その制御には休眠期結核菌抗原を標的とした新規ワクチンが非常に有効であると考えられる。このようなワクチンが開発できれば、BCG を初回免疫に、休眠期結核菌に対するワクチンを追加免疫に用いることによって、再燃を制御できるワクチン戦略の構築が可能になる。本研究では、休眠期結核菌が特異的に発現する遺伝子群である DosR レギュロンタンパク質に対する免疫応答を活動期結核患者、潜伏感染者および非感染者で比較した。その結果、結核患者もしくは潜伏感染者で特異的に T 細胞応答が強く反応した抗原を 12 種類同定することができた。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、結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送機構について明らかにしてきた。しかし、

結核菌感染樹状細胞における小胞輸送機構に関して、ほとんど明らかになっていない。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。その結果、オートファジーアダプタータンパク質である p62 依存的に結核菌オートファゴソームが形成されて、抗原提示分子である 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が明らかになった。

B. 研究方法

1. DosR レギュロンタンパク質に対する T 細胞応答

33 種類の組換え DosR レギュロンタンパク質を用いて、ヒト末梢単核球を刺激した。産生された IFN- γ を ELISPOT 法によって測定した。ヒト試料はインフォームド・コンセントを得た結核患者（12 名）、潜伏感染者（14 名）、非感染者から得た。

2. 結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成の解析

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。

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て実験を行った。

C. 研究結果

1. DosR レギュロンタンパク質に対する T 細胞応答

結核患者と潜伏感染者において T 細胞応答が増強している抗原として、Rv0080、Rv2031、Rv3129 を同定した。これらの抗原では結核患者と潜伏患者では応答の差は認められなかった。また、潜伏感染者において強い T 細胞応答が見られた抗原として、Rv570、Rv2004c、Rv2029、Rv3133c を同定できた。潜伏感染者が結核患者と比較して強く反応した抗原として、Rv570、Rv2028 を同定した。潜伏感染者が非感染者にのみ反応した抗原として、Rv0081、Rv0574、Rv2626c を同定した。

2. 結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成の解析

マウス骨髄由来樹状細胞や樹状細胞株 DC2.4 および JAWSII に結核菌を感染させると、結核菌にオートファジーマーカータンパクである 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。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結果、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。さらに、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。

D. 考察

いくつかの潜伏期特異的発現タンパク質に対する潜伏感染者の T 細胞応答が、結核患者に比べて増大していることを示すことができた。本結果は、これらの免疫応答が結核の発症を抑制していることを示唆する。また、潜伏感染者や活動性結核患者をスクリーニングするために抗原としても本研究で同定したタンパク質を使用することができることも示唆する。

また、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した。結核菌オートファゴソームに MHC II が局在することから、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される。これらの研究成果は、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や樹状細胞における抗原提示機構を説明する手がかりを得ることができた。

E. 結論

潜伏感染者および活動性結核患者において特異的に免疫応答する休眠期発現タンパク質を 12 種類同定することができた。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ることを明らかにすることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Seto S, Tsujimura K, **Koide Y.** 2011. Rab

- GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic*. 12:407-420.
2. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌ファゴソームの成熟阻害機構. *化学療法の領域*. 27: 64-69.
 3. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 2011. 結核菌の細胞内寄生メカニズム. *日本臨床*. 69: 1373-1377.
 4. Sugaya K, Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem Biophys Res Commun*. 410:371-375.
 5. Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2012. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell Microbiol*. 14:710-727.
 6. Osada-Oka M, Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Niki M, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Ohara N, Yamamoto T, Kobayashi K, Matsumoto S. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol*. 2013 57:30-37.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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
1. Tsujimura K, Yamamura Y, Hozumi H, Seto S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. 2011. Cellular and humoral immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2011 (San Diego, USA, 7月).
 2. Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome maturation. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 3. Nagata T, Eweda G, Suzuki D, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Identification of T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 4. Seto S, Tsujimura K, Koide Y. 2011. Localization and function of Coronin-1A in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
 5. Tsujimura K, Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hozumi H, Nagata T, Koide Y. 2011. Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in