

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索とその構造機能解析

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者 森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部・室長)
研究協力者 金 玄 (国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)

研究要旨.

既存の薬剤に耐性を示す多剤耐性結核症や有効な薬剤が少ない非結核性抗酸菌症の治療に有用な新規薬剤の開発が臨床現場では強く求められている。そこで本研究課題では、結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を標的とした新規薬剤の開発を試みるとともに、結核菌に特異的な細胞壁構造や生体内での代謝機能に関わる遺伝子・タンパク質を新規薬剤の標的分子として捉え、その機能と構造の解析を行うことを目的としている。本年度は Rv2613c が有する特異的な基質結合部位を標的部位としたインシリコスクリーニングを行い、約 800 万種類の Drug like な化合物の中から、標的部位と強く相互作用することによって Rv2613c の活性を阻害することが予想される 74 種類の化合物を選んだ。今後はこれらの化合物を用いて、実際に阻害活性を測定するとともに細胞毒性や抗菌活性を調べることによって、新規薬剤の開発につながることを期待される。また、結核菌に特異的な細胞壁構造や NAD 新生経路に関わる 15 種類のタンパク質 (Rv1505c から Rv1516c までの 12 種類と Rv1594, Rv1595, Rv1597) を新規薬剤の標的分子として選び、大腸菌内での発現系を構築し、発現条件の検討を行った。その結果、10 種類のタンパク質について大腸菌内での発現を確認した。さらに、そのうち Rv1509 と Rv1514c については可溶性画分での発現が認められた。今後は Rv1509 と Rv1514c の詳細な機能の解析と立体構造の決定を行うとともに、残りの標的分子についても最適な発現条件を決定することによって、新規薬剤のドラッグデザインを目標とした標的分子の機能構造相関解析を進めることが可能であると考えられた。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌や *Mycobacterium avium* 等の非結核性抗酸菌が引き起こす難治性の感染症が大きな問題となっているにもかかわらず、有効な治療法がほとんど存在しないことから、新たな治療法、特に新規薬剤の開発が臨床現場では強く求められている。現在、いくつかの新規薬剤の開発が進められているものの、それらの多くは既存の薬剤の構造類縁体であることから、薬剤耐性菌の早期出現や交差耐性等が懸念されている。そのため、新しい作用機序をもつ新規

薬剤の開発が重要な課題となっている。特に、結核菌や非結核性抗酸菌にのみ特異的に殺菌活性を示す新規薬剤が求められている。そこで本研究課題では、次に示す2つの研究を行い、新規薬剤の開発に結びつけることを目的としている。1つ目の研究では、これまでに機能と構造の詳細な相関を明らかにした結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素である Rv2613c を標的とした新規薬剤の開発を目的としている。もう1つの研究では、結核菌に特異的な細胞壁構造や生体内での代謝

機能に関わる遺伝子・タンパク質を新規薬剤の標的分子として捉えてその機能と構造の解析を行うことによって、新規薬剤のドラッグデザインに結びつけることを目的としている。

Rv2613c は、遺伝子破壊株を用いた研究や *in silico* 解析の結果より新規薬剤の有力な標的候補の1つとして考えられていることから、Rv2613c の活性を阻害する新規化合物を見出すことは新規薬剤の開発につながるものとして期待されている。これまでに、Rv2613c が特異的な基質結合部位を形成していることを示した (Mori, S., K. Shibayama, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. *J. Mol. Biol.*, 410: 93-104.) (Fig. 1)。このことから、Rv2613c の特異的な基質結合部位と強く相互作用することによって Rv2613c の活性を特異的に阻害する新規化合物をデザインすることが可能であると考えられた。実際に、約 50 万種類の化合物について Rv2613c の基質結合部位を標的としたインシリコスクリーニングを行うことにより、Rv2613c に対して特異的に阻害活性を示す化合物を見出すことができた。従って、インシリコスクリーニングは Rv2613c の新規阻害化合物を見出すのに有用な手法であることが示された。一方、分子量や親水性などから Drug like な化合物として考えられている化合物は現在約 850 万種類存在している。残りの約 800 万種類の化合物全てについてインシリコスクリーニングをおこなうためには、これまでの実験系では膨大な時間が必要であった。そこで、本年度はインシリコスクリーニングの実験系について再構築を行い、約 800 万種類の Drug Like な化合物について Rv2613c の基質結合部位を標的としたインシリコスクリーニングを効率的に行うことを目的とした。

結核菌をはじめとした多くの抗酸菌のゲノムが既に決定されており、その比較研究も盛んに行われている。また、我々の研究グループでは、結核菌における NAD 代謝経路に関する研究も行っている。従って、それらの知見を生かして結核菌に特異的な細胞壁構造や菌体内で重要な代謝経路に関わ

っている遺伝子・タンパク質を新規薬剤の標的分子として選び、その詳細な機能と構造の相関を明らかにすることは、新規薬剤のドラッグデザインにつながることを期待される。そこで本年度は、新規薬剤の標的分子を見出すとともに、標的タンパク質の発現系を構築して発現条件の検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

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

Rv2613c の特異的な基質結合部位と強く相互作用する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インシリコスクリーニングにより行った。インシリコスクリーニングは、CentOS 6 システム上で myPresto (http://www.jbic.or.jp/activity/st_pr_pj/mypresto/index_mypr.html) を使用して行った。また、コア数に応じて計算の負荷を分散させることによって、効率的にインシリコスクリーニングを行った。使用した化合物データベースは、Zinc データベース (<https://docking.org/>) 並びに、LigandBox データベース (<http://ligandbox.protein.osaka-u.ac.jp/ligandbox//cgi-bin/index.cgi?LANG=en>) から入手した。

2. 新規薬剤の標的遺伝子・タンパク質の探索と発現条件の検討

ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*) のゲノム情報とウシ型結核菌 (*M. bovis*) のゲノム情報を比較すると、RD4 と呼ばれる遺伝子領域がヒト型結核菌にのみ存在していることが報告されている (Cole ST. *Microbiology* 148 (2002) 2919-2928)。1次構造情報から、この領域の遺伝子がコードしているタンパク質は細胞壁構造に関与していることが予想できるものの (Table 1)、その詳細な機能や立体構造については報告例がない。結核菌の細胞壁構造は宿主との免疫応答などにおいて重要な役割を果たしていることが知られていることから、

これらのタンパク質の機能を阻害する化合物は新規薬剤として期待される。また、我々の研究グループでは、これまでに結核菌の NAD 代謝経路についての研究も行ってきた。結核菌とヒトでは、NAD 新生経路において出発物質が異なることから（結核菌：アスパラギン酸、ヒト：トリプトファン）、NAD 新生経路を阻害する化合物も結核菌に特異的に作用する薬剤として期待される。そこで、結核菌のゲノム上に存在する RD4 領域上の 12 種類の遺伝子がコードするタンパク質 (Rv1505c から Rv1516c まで)、並びに NAD 代謝経路のうち NAD 新生経路に存在する 3 種類のタンパク質 (Rv2594, Rv1595, Rv1597)、合計 15 種類のタンパク質を標的分子として選んだ (Table 1)。

まず結核菌 H37Rv 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応により 15 種類のタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ増幅させた後、pCold ベクター、または pET23 ベクターに挿入した。次に、作製したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株または HMS174(DE3)pLysS 株に導入して発現系を構築した。構築した発現系について、IPTG 誘導による発現条件の検討を行った。発現タンパク質の確認には SDS-PAGE を用いた。倫理面への配慮 本研究は、バイオセーフティーレベルに応じた該当実験室 (P2 レベルまたは P3 レベル) で行った。実験を行う際には研究所内の安全講習を受講するとともに、実験計画について安全委員会の承認を受けている。また、大臣確認実験を必要とする実験 (組換え DNA 実験) については、必要書類を文部科学省に提出し認可されている。実際の実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

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

インシリコスクリーニングについて、これまでに行っていた環境 (OS: Windows7 ソフト: MOE, MFmyPresto) から新しい環境 (OS: CentOS 6, ソフト: myPresto) にすることや CPU のコア数に応じて計算負荷を

分散させることによって、1日あたり最大で 8 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うことが可能となった。そこで、本手法を用いて、Zinc データベースや LigandBox データベース上で Drug Like な化合物として登録されている約 800 万種類の化合物についてインシリコスクリーニングを行い、Rv2613c の標的部位と強く相互作用することが予想される化合物の絞り込みを行った。その結果、約 74 種類の化合物を Rv2613c の標的部位と強く相互作用することが予想される化合物として選択した。また、選択を行う段階で、毒物・劇物として指定されている化合物は候補化合物からは除外した (Table 2)。

2. 新規薬剤の標的遺伝子・タンパク質の発現系構築と発現条件の検討

ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*) とウシ型結核菌 (*M. bovis*) のゲノム情報の比較、ならびに NAD 代謝経路に関する研究結果から、結核菌に特異的な細胞壁構造や NAD 新生経路に関わる 15 種類のタンパク質 (Rv1505c から Rv1516c までの 12 種類と Rv1594, Rv1595, Rv1597) を新規薬剤の標的分子として選んだ (Table 1)。選んだ 15 種類のタンパク質について、大腸菌を宿主とした発現系を構築して、発現条件の検討を行った。その結果、15 種類のタンパク質のうち、10 種類のタンパク質 (Rv1505c, Rv1506c, Rv1507c, Rv1508c, Rv1509, Rv1513, Rv1514c, Rv1515c, Rv1516c, Rv1597) について、大腸菌内での発現を確認した (Fig. 2 上段)。さらに、そのうち Rv1509 と Rv1514c タンパク質については、可溶性画分での発現が認められた (Fig. 2 下段)。

D. 考察

約 800 万種類の Drug like な化合物の中から、Rv2613c の標的部位と強く相互作用することが予想される化合物として 74 種類の化合物を選ぶことができた (Table 2)。今後は、これらの化合物を用いて実際に Rv2613c に対する阻害活性を測定すること

や、細胞毒性や抗菌活性を調べることによって、新規薬剤の開発につながることを期待される。

新規薬剤の標的分子として選んだ 15 種類のタンパク質の発現系を構築し、10 種類のタンパク質の発現条件を決定した。さらに、そのうちの 2 種類のタンパク質 (Rv1509 と Rv1514c) については可溶性画分での発現を確認した (Fig. 2)。今後は Rv1509 と Rv1514c の詳細な機能の解析と立体構造の決定を行うとともに、残りの標的分子についても最適な発現条件を決定することによって、新規薬剤のドラッグデザインを目標とした標的分子の機能構造相関解析を進めることが可能であると考えられる。

E. 結論

約 800 万種類の Drug like な化合物の中から、Rv2613c の活性を阻害する化合物の候補として 74 種類の化合物を選択した。

新規薬剤の標的分子として 15 種類のタンパク質を選び発現系を構築した。そのうち 2 種類タンパク質について可溶性画分に発現する条件を決定した。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv for the design of new anti-tuberculosis drugs. International Conference on Structural Genomics. 29 July-1 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 2) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. US-Japan Cooperative Medical Science Program:

Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

- 3) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. Functions and structures of MAV_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG_2932 from *M. smegmatis*. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月 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
3. その他 なし

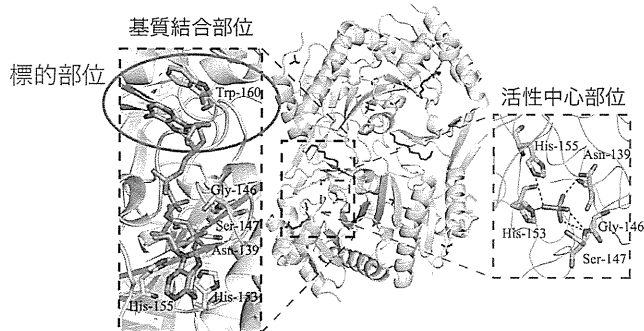


Fig. 1 結核菌由来 Rv2613c の立体構造と標的的部位

Table 1 新規薬剤の標的タンパク質

Locus	予測される機能
Rv1505c	Fucokinase
Rv1506c	Methyltransferase family
Rv1507c	WbqC-like protein family
Rv1508c	Glycosyltransferase
Rv1509	Methyltransferase family
Rv1510	Membrane protein
Rv1511	GDP-D-mannose dehydratase
Rv1512	GDP-L-fucose synthase
Rv1513	Methyltransferase family
Rv1514c	Glycosyltransferase family
Rv1515c	Methyltransferase family
Rv1516c	Glycosyltransferase family
Rv1594	Quinolinate synthetase
Rv1595	L-aspartate oxidase
Rv1597	Methyltransferase family

Table 2 インシリコスクリーニングの結果 (一部)

化学式	分子量	化学式	分子量
C18H19N3O4	341.36	C23H23N3O4S	437.51
C22H18N4O5	418.40	C22H17N7O3	427.42
C23H20N4O6	448.43	C25H23N3O6S	493.53
C18H18N4O6	386.36	C24H28N4O4S	468.57
C20H20N4O3	364.40	C19H18N4O5	382.37
C22H23N3O4S	425.50	C25H22N2O7	462.45
C27H22N2O7	486.47	C25H21ClN2O7	496.90
C26H36N4O5	484.59	C21H24N2O8	432.42
C28H22N2O6	482.48	C28H21N5O4	491.50
C25H21N3O5	443.45	C26H24N4O4	456.49
C16H18N6O4S	390.42	C25H29N3O5	451.51
C24H19N5O5S	489.50	C22H27FN4O6S	494.54
C25H22N6O4	470.48	C23H30N2O6	430.49

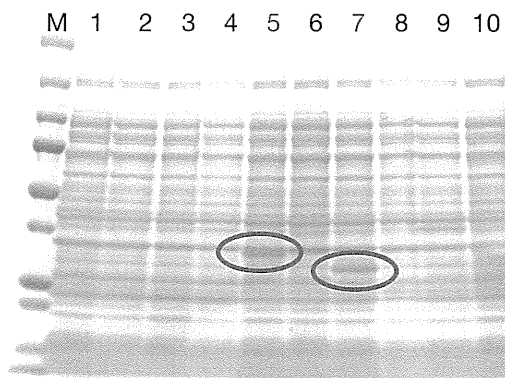
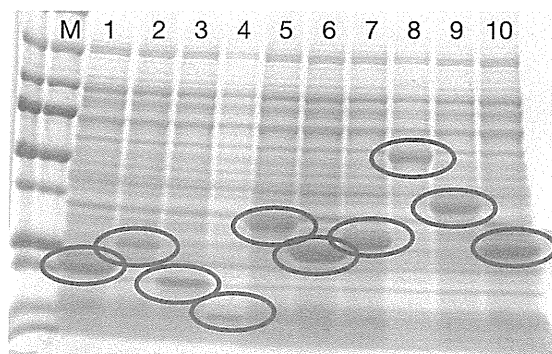


Fig 2. 標的遺伝子の発現条件検討 (上段: 発現結果、下段: 可溶性画分)

M: Marker, 1: Rv1505c, 2: Rv1506c, 3: Rv1507c, 4: Rv1508c, 5: Rv1509, 6: Rv1513, 7: Rv1514c, 8: Rv1515c, 9: Rv1516c, 10: Rv1597

平成25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)

追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリーT細胞の
分化調節機構の解析

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による
細胞障害性メモリーT細胞の分化調節機構の解析

研究分担者 田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
研究協力者 下袴田 陽子（国立感染症研究所・感染制御部・研究員
国立療養所多磨全生園・医師）

研究要旨

現行の結核ワクチンである BCG は小児に対する予防効果は高く小児期の初回ワクチンとしての有用性は認められているものの、その有効期間が短く、成人に対する予防効果は極めて低い。したがって成人の結核予防に有効な追加免疫法を開発することは急務である。追加免疫では初回免疫において誘導された細胞障害性メモリーT細胞(メモリーCTL)の質的、量的な増強と初回免疫後に生成した未感作 CD8 T細胞からメモリーCTLへの分化が誘導される。未感作 CD8 T細胞からメモリーCTLへの分化は CD4 T細胞による樹状細胞の成熟化が不可欠であると考えられている。したがって効果的な追加免疫法を開発するためにはメモリーCTLの分化誘導に必要な CD4 T細胞による樹状細胞の成熟化機構を明らかにすることが重要である。

これまでに選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できる結核菌分泌タンパク Ag85B 由来の Th1 ペプチド：Peptide-25 を介した CD4 T細胞との相互作用によって成熟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、この樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって CD4 T細胞から産生される IL-17F が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究課題ではメモリーCTLの分化誘導に必要な樹状細胞の成熟化誘導における IL-17F の役割を明らかにすることで新たな追加免疫法の開発戦略を得ることを目的とした。

本年度は Peptide-25 刺激によって誘導される IL-17F がメモリーCTL分化に必須であるかを明らかにすることを目的とし解析を行なった。

その結果、エフェクターメモリーCTLの分化を効率よく誘導する樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって産生された IL-17F が必須であることが明らかになり、IL-17F を追加免疫時に添加することによって効率よくエフェクターメモリーCTLの分化が誘導される可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、高齢者の結核のみならず、若年・青年層の結核の増加が懸念されている。現在実用化されている唯一の結核ワクチンである BCG は小児における結核性髄膜炎や粟粒結核などの播種性のものには十分な予防効果が認められているものの、その有効期間が短く、成人に接種しても予防効果は極めて低い。この事実は BCG が細胞障害

性メモリーT細胞(メモリーCTL)の分化誘導効率が低いこと、成人に対する追加免疫に不適であることを示している。したがって、成人の結核予防に有効な追加免疫法を開発することが強く求められている。

追加免疫の使命は初回免疫において誘導されたメモリーCTL(1次メモリーCTL)の質的、量的な増強と初回免疫後に生成した未感作 CD8 T細胞からメモリーCTLへの分

化を誘導することにある。メモリーCTLの恒常的な維持にはIL-15などのサイトカインが重要な役割を果たしていることが報告されているが、追加免疫による1次メモリーCTLの再活性化後のメモリーCTL(2次メモリーCTL)への質的、量的動態に関しては不明な点が多い。一般的には追加免疫においては1次メモリーCTLが2次メモリーCTLとエフェクターCTLに分化すると考えられているが、追加免疫時に未感作CD8 T細胞から誘導される1次メモリーCTLが量的に2次メモリーCTLを凌駕するとの報告もある。

未感作CD8 T細胞から1次メモリーCTLへの分化は未感作CD8 T細胞が最初に抗原を認識する時点で決定され、その決定にはCD4 T細胞による樹状細胞の成熟化が不可欠であると考えられている。未感作CD8 T細胞及び1次メモリーCTLいずれの細胞も活性化には樹状細胞による抗原提示が必要である。したがって、効果的な追加免疫法を開発するためには1次メモリーCTLの分化誘導に必要なCD4 T細胞による樹状細胞の成熟化機構を明らかにすることが重要である。

結核菌の分泌タンパクであるAg85Bはヒト、マウスに対して強い免疫原性を有し、このタンパクのみで強力にTh1分化を誘導することが知られている。これまでに、①Ag85Bのヘルパーエピトープを検索し、15個のアミノ酸からなるPeptide-25(アミノ酸配列:FQDAYNAAGGHNAVF)が、I-A^b拘束性に選択的かつ強力にTh1免疫応答を誘導できるTh1ペプチドであること、さらに卵白アルブミン(OVA)特異的T細胞抗原受容体(TCR)を発現するトランスジェニック(Tg)マウス(OT1)を用いた*in vitro* CTL分化誘導実験系による解析から②Peptide-25を介したCD4 T細胞との相互作用によって成熟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、③この樹状細胞の成熟化にはPeptide-25刺激によってCD4 T細胞から産生されるIL-17Fが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

本研究課題では1次メモリーCTLの分化誘導に必要な樹状細胞の成熟化誘導におけるIL-17Fの役割を明らかにすることで新たな追加免疫法の開発戦略を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) Peptide-25 特異的 CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養による未成熟樹状細胞の成熟化の検討

C57BL/6 マウスの両大腿、下腿より骨髓を採取し、赤血球、CD4 及び CD8 細胞、好中球、B 細胞を除去した骨髓細胞をマウス GM-CSF 存在下に 6 日間培養し CD40 陰性、CD86 陰性未成熟樹状細胞(未成熟 BMDC)を調製した。また、Peptide-25 特異的 TCR を発現する Tg マウス(P25 TCR-Tg)脾臓細胞より CD4 T 細胞(P25-CD4 T 細胞)を、OT1 マウス(C57BL/6 バックグラウンド)脾臓細胞より CD8 T 細胞(OT1-CD8 T 細胞)を調製した。

P25-CD4 T 細胞と Peptide-25 が共存する条件で未成熟 BMDC に OVA を取り込ませ、培養 1 日後の P25-CD4 T 細胞からの IL-17F 産生を細胞内染色法に検討した。また、培養 1 日後に P25-CD4 T 細胞及び余剰の抗原を取り除き、OT1-CD8 T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT1-CD8 T 細胞のグランザイム B 産生を指標に CTL への分化度を評価した。

(2) P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養によって成熟化した樹状細胞によるメモリーCTLの分化誘導能の検討

C57BL/6 脾臓細胞より樹状細胞(sDC)を調製した。P25-CD4 T 細胞と Peptide-25 が共存する条件で sDC に OVA を取り込ませ、培養 1 日後に P25-CD4 T 細胞及び余剰の抗原を取り除き、OT1-CD8 T 細胞と培養した。培養 3 日後に OT1-CD8 T 細胞から mRNA を調製し、Blimp1, Bcl-6 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法に検討した。

(3)メモリーCTLの分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割の検討

Peptide-25 と OVA をフロイント不完全ア

ジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウスまたは IL-17F 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド：琉球大学 梅村 正幸博士より分与) の背部皮下に免疫した。

免疫 10 日後に回収した脾臓細胞を OVA 遺伝子導入 EL-4 胸腺腫細胞 (E. G7) と 5 日間 *in vitro* で培養した。培養後に生細胞を回収しエフェクター細胞とした。標的細胞として CFSE 標識 E. G7 を、その対照として CFSE 標識 EL-4 を用い、各種濃度のエフェクター細胞と 4 時間共培養し、CFSE (生細胞認識蛍光色素) 及び 7AAD (死細胞認識蛍光色素) の輝度を指標とし、CTL 活性を評価した。

倫理面への配慮 実験に供したマウスの飼育、維持は国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

C. 研究結果

(1) P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養による未成熟樹状細胞の成熟化の検討

これまでの研究では抗原提示細胞として sDC を用いていた。sDC には骨髄系樹状細胞 (cDC) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) が含まれる。この内、cDC のみが未感作 CD4 T 細胞の活性化能を有している。cDC は骨髄前駆細胞が血行性にリンパ組織に移行しつつ、分化成熟することが知られている。非感染マウスの脾臓中の cDC はほぼ未成熟 cDC であるが、成熟 cDC の混入の可能性は否定できない。そこで、骨髄細胞より常法に従い調製した未成熟 BMDC を抗原提示細胞として用いた。調製した未成熟 BMDC は未感作 CD4 T 細胞の活性化に必須の CD40 及び CD86 分子の発現がないことを FACS にて確認した。この未成熟 BMDC を P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 と共培養した。その結果、未成熟 BMDC を用いた場合にも P25-CD4 T 細胞からの IL-17F 産生は sDC を用いた場合と同程度に誘導された。さらに、P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養で成熟化した BMDC は未感作 CD8 T 細胞をグランザイム B が産生できる機能的 CTL へと分化させた。

(2) P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養によって成熟化した樹状細胞によるメモリー CTL の分化誘導能の検討

未感作 CD8 T 細胞が CD4 T 細胞の 'Help' 存在下に成熟化した樹状細胞によって抗原提示を受けるとエフェクター CTL へと分化し、一部はさらにメモリー CTL へと分化すると思われる。メモリー CTL はさらに末梢の非リンパ組織に移行するエフェクターメモリー CTL (TEM) と 2 次リンパ組織に留まるセントラルメモリー CTL (TCM) に分類される。TEM は転写抑制因子 Blimp1 陽性、Bcl-6 陰性であるのに対し、TCM は Bcl-6 陽性であることが報告されている。そこで、P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養によって成熟化した樹状細胞によって分化誘導された機能的 CTL の Blimp1 及び Bcl-6 mRNA の発現様式をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、未感作 CD8 T 細胞に比べ Peptide-25 によって誘導された機能的 CTL では blimp1 mRNA の発現が 3.4 倍に増強されたのに対し、bcl-6 mRNA の発現は 0.7 倍に減弱した。

(3) メモリー CTL の分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割の検討

これまでに P25-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 の中和抗体を添加すると IL-17F の中和抗体用量依存的に OVA 特異的メモリー CTL の分化頻度が低下すること、P25-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 rIL-17F を添加すると OVA 特異的メモリー CTL 細胞の分化頻度が高まること、またマウスに Peptide-25 と OVA を共免疫すると OVA 特異的 CTL 活性が OVA 単独に比べ顕著に増強することを明らかにしている。

そこで、Peptide-25 によるメモリー CTL 分化誘導におけるマウス生体内での IL-17F の役割を IL-17F 欠損マウスを用いて検証した。Peptide-25 と OVA をフロイント不完全アジュバントに懸濁し、IL-17F 欠損マウスに免疫した。免疫 10 日後の OVA 特異的 CTL 活性を CFSE 及び 7AAD を用い

た FACS 解析にて検討した結果、野生型マウスで見られる Peptide-25 による OVA 特異的 CTL 活性の増強効果は IL-17F 欠損マウスでは全く見られなかった。

D. 考察

未成熟 BMDC を用いた場合でもメモリー CTL の分化が効率よく誘導されたことから、メモリー CTL の分化を誘導できる樹状細胞の成熟化には TLR などの病原体認識受容体非依存的な Th1 ペプチドを介した CD4 T 細胞との相互作用のみで十分であることが示された。現在感染症予防に使用されているワクチンには樹状細胞を含む自然免疫担当細胞の活性化・成熟化を促すアジュバントを含むものが多く存在するが、一方でアジュバントの副作用による安全性が問題となっている。本研究で得られる成果によってアジュバントを必要としないワクチン及び追加免疫法の開発戦略が得られることが期待できる。

P25-CD4 T 細胞及び Peptide-25 との共培養で成熟化した樹状細胞は TEM の分化を誘導した。結核菌感染後 2 次リンパ組織での獲得免疫の誘導・活性化は他の感染症に比べ遅延することは良く知られている。これは感染局所で結核菌を取り込んだ樹状細胞が 2 次リンパ組織に移行できないことが一因であると報告されている。したがって、追加免疫によって 2 次リンパ組織に留まる TCM への分化が誘導された場合、2 次リンパ組織内での樹状細胞による抗原提示が遅延するため、結果として予防効果が発揮できない可能性が考えられる。追加免疫によって TEM への分化が誘導されれば、感染局所での結核菌特異的な CTL の活性化が誘導され予防効果が期待できる。IL-17F によって成熟化した樹状細胞は TEM の分化を効率よく誘導できることから、IL-17F は追加免疫に有用であることが示唆された。

TCR に対して低親和性で P25 CD4 T 細胞を Th2 細胞へと分化させる Peptide-25 の変異体である APL 及び P25-CD4 T 細胞との共培養で成熟化した樹状細胞はメモリー CTL の分化を誘導できない。この培養環境

下で成熟化した樹状細胞は Peptide-25 及び P25-CD4 T 細胞との共培養で成熟化した樹状細胞と同程度の IL-17 受容体を発現している。そこで、APL 及び P25-CD4 T 細胞と樹状細胞を共培養する際に rIL-17F を添加したがメモリー CTL の分化は誘導できなかった。この事実は IL-17F による樹状細胞の成熟化には CD4 T 細胞が産生する共因子が必要であることを示唆している。この共因子を同定することで、より効果的な追加免疫法の開発が期待できる。

現在、追加免疫法としての IL-17F の有用性を確定するために、初回ワクチンとして BCG、追加免疫として Peptide-25 を接種することでマウスの結核菌に対する抵抗性が增強されるかを検討中である。

E. 結論

本年度の研究から、エフェクターメモリー CTL の分化を効率よく誘導する樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって産生された IL-17F が必須であることが明らかになり、IL-17F を追加免疫時に添加することによって効率よくエフェクターメモリー CTL の分化が誘導される可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T, Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2013. Efficient activation of human T cells of both CD4 and CD8 subsets by urease deficient-recombinant BCG that produced heat shock protein 70-*Mycobacterium tuberculosis*-derived major membrane protein-II fusion protein. *Clinical Vaccine and Immunology*, in press.
- 2) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. 2013. Towards novel tuberculosis and leprosy vaccine development : The role of

Th1-inducing peptide in cytotoxic T cell differentiation. Japanese Journal of Leprosy, in press.

2. 学会発表

- 1) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program : Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 2) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program : Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013, Milano, Italy.
- 4) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013, Milano, Italy.
- 5) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて—Th1分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析—. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 6) 下袴田陽子, 田村敏生, S. Nutt, 牧野正彦. 抗酸菌感染における濾胞ヘルパー T 細胞の動態. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 7) 前田百美, 向井徹, 福富康夫, 田村敏生, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームを構成するタンパクの解析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 8) Matsumura, K., K. Ishii, N. Miyamura, Y. Nakamura, T. Tamura, and K. Kawakami. Generation of transgenic mice expressing TCRab specific for mannoprotein from *Cryptococcus neoformans*. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 2013 年 12 月 千葉市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成25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)

結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチンへの応用

分担研究報告書

研究分担者

松本 壮吉

(新潟大学大学院・教授)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチンへの応用

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）

研究要旨.

多くの成人型肺結核は内因性再燃により発症するが、現行の BCG ワクチンはその抑止能が低い。潜在期に結核菌は、休眠期に移行しているため増殖期とは異なる分子を産生していると考えられることから、潜在期の結核菌機能分子を抗原としてワクチンに利用すれば、成人型肺結核を予防できる可能性がある。そのような成人型肺結核に効果がある新しいワクチン開発が本研究の目的である。本年度の研究では、潜在期に産生される結核菌蛋白質に対する T 細胞応答の有無を結核菌感染者において検証した。その結果、結核菌の潜在期蛋白質に対して T 細胞応答が生じていることを確認した。また休眠菌を作成し、その抗原性を試験した結果、マウスマクロファージに対する炎症性サイトカイン誘導能が顕著に低下していること、および休眠菌では抗原性糖脂質の合成が低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

乳幼児結核に対する BCG のワクチン効果は広く認められており、粟粒性結核など播種性結核の重症化を阻止することが知られているが、効果の持続期間については疑問が多く、成人の肺結核に対する効果は低い、もしくは否定的である。成人型肺結核の多くは、休眠(dormant)菌の再増殖、すなわち内因性再燃によって発症することから、BCG の単回免疫は内因性再燃の抑止能が低いと考えられ、このような現状から結核の制御にむけて新しいワクチンの開発が必要であるが、BCG は小児に対して一定の効果があるうえに、成分ワクチンが生ワクチンである BCG を上回る効果を発揮するとは期待し難く、初回免疫は BCG やその改良型 BCG（例；組み換え BCG）で免疫し、成人期に複数の抗原の組み合わせによる成分ワクチンかウイルスベクターを用いた組み換えワクチンによるブースターワクチンを投与する方向性が結核ワクチン開発において現実的である。ブースターワクチン候補抗原には、増殖期の結核菌抗原のみならず潜在期の抗原を追加することで、潜伏結核菌に免疫応答による攻撃を加え続け内因性再燃を

抑止できる可能性がある。

一方、BCG も結核菌同様、生体内で増殖を停止し休眠期へと移行すると推定される。休眠期の BCG は結核菌と同様、増殖期とは異なる抗原を産生するため、増殖期から休眠期への移行が、成人型肺結核における BCG の効果の減衰に関わる可能性もあるが、増殖期の変遷と BCG の効果の相関はこれまで解析されていない。特に休眠菌の糖脂質抗原についての解析は皆無であるが、結核防御免疫になんらかの作用を及ぼす可能性がある。

上記の背景と考察をもとに本研究では、結核菌感染者における結核菌の増殖期と休眠期蛋白質に対する T 細胞応答を解析した。また、試験管内で休眠菌を作成し、休眠菌自体の抗原性や休眠菌が産生する糖脂質抗原を解析した。

B. 研究方法

結核菌蛋白質の調整

結核菌蛋白質である ESAT6、CFP10、HBHA、MDP1、Acr の遺伝子を結核菌 H37Rv 株ゲノム DNA をテンプレートして、PCR 法でクローニングし配列を確認後、pET22b プラスミ

ドに導入、さらに大腸菌を作成したプラスミドで形質転換した。各種組み換え大腸菌から、それぞれの蛋白質をニッケルカラムを用いて精製した。SDS-PAGE で精製度を確認し、精製度の低いものに関してはさらにゲル濾過を行いピュアリティを向上させた。T 細胞刺激用の蛋白質に関しては、内毒素除去カラムを用いて内毒素を除去し、その混入が 0.25 EU/ml 以下であることをリムルス試験にて確認した。

結核菌蛋白質に対する T 細胞応答の検出 T 細胞応答の解析は、東京病院にてインフォームドコンセントを得た後に、12 名の被検者から採血し末梢血中単核球を分離、各種結核菌蛋白質と 0.9-25 µg/mL の濃度になるように加え 15 時間反応させた。CD4, CD8, IFN-γ, IL-2, IL-17, TNF-α 抗体で染色し、FACS にて各種サイトカイン産生細胞率を検討した。

休眠 BCG の解析

低酸素下で結核菌を休眠させる Wayne モデルを用いて BCG を休眠させた。休眠菌であることはイソニアジド抵抗性とメトロニダゾール感受性で判定した。マウス骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で培養してマクロファージに分化後、休眠菌と対照として酸素存在下で培養し吸光度 0.5 前後の菌を増殖菌として感染させた。感染後、経時的に TNF-α 産生量を ELISA 法にて測定した。マクロファージの刺激は、無酸素下でも実施した。また、糖脂質の解析を行うために、遠心集菌後ビーズを用いて菌を機械的に破碎し chloroform・methanol で脂質画分を抽出後、acetone への可溶性で分離を行った。粗抽出した糖脂質を、様々な溶媒も用いて二次元および二次元の薄層クロマトグラフィー (TLC) を行い、増殖菌と休眠菌での差異を検討した。

倫理面への配慮 大阪市立大学大学院医学研究科、国立病院機構東京病院で人検体を用いた研究計画書の倫理申請を行い、検者に対してインフォームドコンセントを得て検体を取得し研究を行った。

C. 研究結果

結核菌感染者における各種結核菌抗原に対

する T 細胞応答

検体由来末梢血単核球を抗 CD3、CD4、CD8 抗体で染色後、各種サイトカイン抗体で染色した。CD4 陽性細胞の反応で、各種結核菌抗原 (PPD、ESAT6、CFP10、Acr、HBHA、MDP1) に対する IFN-γ 産生は、結核菌非感染健常者に比べ結核菌感染者 (結核患者、治療終了者、QFT 陽性コンタクト) で有意に高かったが、結核患者、治療終了者、QFT 陽性コンタクト間での差異は認められなかった。一方、HBHA 刺激による IL-2 産生 CD4 陽性 T 細胞は、結核患者と治療終了者で高く、QFT 陽性コンタクトでは検出できないことから、HBHA 反応性 CD4 陽性 T 細胞は、活動性結核を示唆する可能性が示された。

複数のサイトカインを産生するポリファンクショナル T 細胞が、感染防御により積極的に関与することが示されている。IFN-gamma と IL-2 同時産生 CD4 陽性細胞を検出したところ、Acr を除く各種結核菌抗原で結核菌非感染健常者に比べ結核菌感染者で有意に高いことがわかった。しかしながら結核菌非感染健常者の中には、結核菌各種抗原に対する反応者も存在した (PPD (3/8 名)、ESAT6-CFP10 (1/8 名)、HBHA (2/8 名)、MDP1 (1/8 名))。

Th-17 細胞も肉芽腫形成や結核防御に関与することが報告されている。PPD、HBHA および MDP1 反応性 CD4 陽性 IL-17 産生細胞 (Th-17 細胞) は、結核菌感染者で有意に高く、HBHA と MDP1 反応性 Th-17 細胞は、その中でも、治療中の結核患者と治療終了者で高い傾向が認められた。

一方、IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞は、防御免疫を抑制する作用があると考えられる。IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞の活性化を検出したところ、Acr を除く結核菌抗原で有意に高い傾向がみられた。Acr 応答性 IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞に関しては、無症候感染者に比べ治療終了者において低い傾向が認められた。

休眠 BCG の抗原性と糖脂質抗原の産生

メチレンブルーを添加した Dubos 培地を用いて密封容器内で BCG を培養した。メチ

レンブルー色素の消失を指標として酸素の消失を判定し、得られた BCG の薬剤感受性を試験した結果、イソニアジド耐性でメトロニダゾル感受性の表現型を得たロットを休眠菌とした。休眠菌を走査型電子顕微鏡で観察すると、菌長の短縮と分裂痕の消失が確認された。

休眠菌と、対照として Dubos 培地で増殖させた BCG を用いて、マウスの骨髄細胞由来のマクロファージに感染させ、産生される TNF- α 量を測定した結果、休眠菌刺激は、増殖菌刺激に比べサイトカイン誘導活性が顕著に低いことが分かった。また、同様の実験を潜在期を想定した無酸素下で実施したところ、増殖菌刺激によると酸素存在下と同様のレベルで TNF- α 産生が認められたが、休眠菌の誘導性は非常に低いレベルであった。さらに、結核菌リポ蛋白質のリガンドである TLR-2 分子の欠失マウスとトレハロースモノミコール酸 (TDM) のリガンドである Mincle の欠失マウスを用いて、骨髄細胞由来マクロファージへの感染実験を同様に行ったところ、酸素の有無に関わらず、TLR-2 欠失マウス由来のマクロファージは、増殖期 BCG 刺激による TNF- α 産生が殆ど消失することが分かった。一方、Mincle 欠失マウス由来マクロファージにおける TNF- α 産生量は野生マウス由来マクロファージの産生量と比較し若干低い傾向は認められたが、殆ど変わらぬ程度であった。

次に休眠菌と増殖菌における糖脂質抗原に差異がみとめられるかを検討した。菌体を破碎後、アセトン可溶画分と不溶画分に分離し様々な条件で TLC を行った。その結果、休眠菌において、アセトン可溶画分で増加するスポットと、アセトン不溶画分で減少するスポットを認めた。変動のあった各スポットの同定を行った結果、休眠菌ではトリアシルグリセロールの増加と、トレハロースモノミコール酸 (TMM) とトレハロースモノミコール酸 (TDM) の減少を確認した。

D. 考察

結核の発症を抑制している潜在期におい

て防御免疫の誘導を担う抗原を同定することが、新しい結核ワクチン開発につながる。本研究ではまず、防御抗原候補の探索を目的として、結核菌が感染していると推測される 12 名の QFT 試験陽性者より末梢血単核球を分離し、休眠期結核菌が産生する機能性蛋白質と反応させ、T 細胞の活性化の結果産生されるサイトカインを多重染色 FACS を用いて検出した。12 名のうちわけは、治療中の結核患者が 2 名、治療完了者が 5 名、健常接触者が 4 名、予防投薬中患者が 1 名である。また、結核既往歴や患者との接触歴のない QFT 陰性者 8 名を対照者とした。抗原には、PPD に加え、増殖期の結核菌蛋白質で抗原性を有する ESAT6 と CFP10、潜在期においても発現する機能分子、HBHA、Acr、MDP1 について検討した。

検討の結果、いずれの試験蛋白質に対しても、反応性の IFN- γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞、すなわち防御的 Th1 細胞が、患者、治療者を問わず活性化されていることが分かった。複数のサイトカインを産生する CD4 陽性 T 細胞に関しては、HBHA 反応性 IFN- γ -IL-2 産生 CD4 陽性 T 細胞が、結核の活動性と相関していた。また、防御的といわれる Th-17 細胞についても HBHA と MDP1 に対する応答レベルと結核の活動性との相関が認められた。HBHA や MDP1 は動物による投与実験で結核予防効果があることが判明しており、抗原に反応する T 細胞が、活動期において防御的に作用している可能性が考えられる。一方、休眠期抗原の Acr は防御応答に抑制的である IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞の活性化能が低いことから、結核の病態形成になんらかの作用を示すと思われた。

今回の小規模検討において、増殖期抗原に加え潜在期で発現する防御抗原に対する T 細胞応答が実際に結核菌感染者で生じていることが分かった。より十分な検体数で本成果の確認を行うことや、検出した T 細胞応答が結核防御的に実際に作用しているかを明らかにすることが、今後の検討課題である。

一方、牛型結核菌弱毒株の BCG を用いて

低酸素下で休眠菌を作成し、マウスマクロファージの感染させて炎症性サイトカイン TNF- α の誘導能を検討した結果、休眠菌における誘導能の顕著な減衰を見いだした。このメカニズムは、結核菌が宿主防御免疫の誘導を回避させて潜伏感染を成立させたり、BCG ワクチンの生体投与後の効果の減衰と関連するかもしれない。

休眠菌の抗原性の減衰に関わる責任分子の探索を行うため、増殖菌と休眠菌の糖脂質産生パターンを比較検討した。その結果、休眠 BCG がトリアシルグリセロールを盛んに合成し、TMM や TDM の合成量が低下していることが分かった。トリアシルグリセロールは抗原性に乏しく、TMM や TDM は免疫原性が高いことから、休眠菌における抗原性糖脂質の合成の減少は、休眠菌に対する免疫不応答の原因となっている可能性がある。

E. 結論

潜在期にも発現する結核菌の接着分子や増殖抑止分子に応答する防御的 T 細胞が、結核菌感染者で誘導されていることが分かった。一方、低酸素休眠菌のマウスマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生能の減衰と、休眠菌における抗原性糖脂質の産生低下を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) Osada-Oka, M., S. Matsumoto, Y. Ozeki, and Y. Minamiyama. Ferritin superfamily protein-like activity

in mycobacterial DNA-binding protein 1. 6th Joint Meeting of The Societies for Free Radical Research Australasia and Japan. 12-14 September, 2013, Sydney, Australia.

- 2) 松本 壮吉. 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 2013 年 5 月 さいたま市
- 3) 岡 真優子、松本 壮吉、尾関 百合子、市川 寛、南山 幸子. 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 2013 年 6 月 名古屋市
- 4) 岡 真優子、松本 壮吉、尾関 百合子、南山 幸子. 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 2013 年 8 月 三原市
- 5) 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. 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 2013 年 11-12 月 津市
- 6) 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 2013 年 10 月 長崎市
- 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. 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. 2013 年 10 月 長崎市
- 8) 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. 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 2013 年 10 月 長崎市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成25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)

PD-1 経路のシグナル伝達制御による抗結核感染防御増強へのアプローチ

分担研究報告書

研究分担者

河村 伊久雄

(京都大学大学院・准教授)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

PD-1 経路のシグナル伝達制御による抗結核感染防御増強へのアプローチ

研究分担者 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）

研究要旨.

PD-1 を介したシグナルは、結核菌感染初期の過剰な防御応答を抑えるために重要な役割を果たす。また、PD-1 欠損マウスに BCG を感染させた場合、BCG 感染 3 週目以降の抗原特異的 Th1 型サイトカイン産生および防御免疫応答が、正常マウスに比較して有意に増強することが示された。これらの結果は、PD-1 シグナル経路の制御がワクチン効果の増強に結びつくことを示唆するものである。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。正常マウスに結核菌を感染させると、感染約 1 年後にマウスはすべて死亡した。しかし、予め BCG 免疫しておくことにより、結核菌感染後のマウスの平均生存日数の著明な増加と肺内菌数の減少が認められた。一方、抗 PD-1 抗体を投与しても、BCG ワクチンの増強効果は認められなかった。また、BCG 接種後に結核菌を感染させたマウスより得られた T 細胞のサイトカイン産生能は、結核菌のみを感染させたマウス由来 T 細胞のサイトカイン産生能よりも弱く、抗 PD-1 抗体を加えてもその活性は改善されなかった。さらに、BCG 接種した PD-1 欠損マウスに結核菌を感染させた場合には、肺における重篤な炎症反応は惹起されず、死亡するマウスは全く認められなかった。以上の結果から、PD-1 シグナルは感染初期に抗原特異的 T 細胞の過剰な機能発現の抑制には関与するが、メモリー T 細胞の機能制御にはそれほど関与しないことが示唆された。

また、結核菌感染マクロファージでは、NLRP3 依存的な inflammasome 形成を介して caspase-1 が活性化され、成熟型 IL-1 β 産生が誘導される。そこで、結核菌に対する感染防御の誘導に重要な役割を果たすと考えられる IL-1 産生における NALP3-inflammasome 活性化の意義を明確にするため、NLRP3、caspase-1、あるいは apoptosis-associated spec-like protein containing card (ASC) を欠損したマウスに結核菌を感染させ、その後の感染防御応答について解析した。その結果、ASC は NLRP3 依存的な inflammasome 形成や caspase-1 活性化に依存せずに、結核菌に対する感染防御に関与することが明らかとなった。さらに、ASC は感染抵抗性を担う T 細胞の分化あるいは機能発現に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

WHO の報告によると、2011 年に発生した結核患者数は約 870 万人で、結核による死亡者数は約 140 万人に上る。また、現在世界人口の 3 割が結核に感染していると考えられていることから、結核は今なお最大の

感染症といえる。我が国では、1950 年以降結核発症率の著しい改善をみているが、今なお低蔓延常態が続いている。さらに、多剤耐性結核菌の出現頻度の増加や、結核発症率が高いアジア・アフリカ地域の発展途上国からの人的流入などにより、今後我が

国における結核の増加が懸念されている。

マウスに結核菌を感染させると、菌は肺、脾臓、および肝臓に速やかに到達する。その後、菌はマクロファージや樹状細胞に取り込まれるが、ファゴリソソームの融合阻害や、アポトーシスによる細胞死を制御することによりマクロファージ内で増殖する。一方、結核菌の感染は自然免疫応答を刺激するため、宿主体内では感染早期に非特異的防御反応が惹起される。しかし、自然免疫応答だけでは結核菌の増殖を抑えることはできず、結果として感染後 1-2 週間は菌の増殖が認められる。しかし、感染後 2-3 週間が経過すると、感染宿主体内では自然免疫応答が引き金となって結核菌特異的な Th1 型 CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞が誘導される。これら抗原特異的 T 細胞は IFN- γ や TNF- α などの Th1 型サイトカインを産生してマクロファージを活性化し、その殺菌能を飛躍的に亢進させる。また、CD8⁺ T 細胞は granulysin を放出することにより殺菌活性を発揮すると共に、増殖の場である感染細胞を破壊することで感染防御に関与する。一方、このような結核菌に対する強い感染防御応答が、宿主に有害な影響を及ぼしている。例えば、肉芽腫内部で結核菌に対する防御免疫が過剰に誘導された場合には、付随的に正常組織までが破壊され、結核に特有の感染病像が出現する。結核菌感染による肉芽腫病変内部が乾酪壊死を起こし、空洞化するのはこのためである。一方、加齢に伴って T 細胞上の costimulatory 分子やインテグリンの発現量の低下、あるいはメモリー T 細胞プールが減少することが報告されており、こうした T 細胞機能の質的および量的な低下が結核に対する抵抗性を減弱させ、結果として高齢者における結核の高い罹患率に結びつくものと考えられている。従って、結核に対する感染防御では、防御免疫応答の発現を適切にコントロールすることが重要な要素となる。

PD-1 は、アポトーシスに陥った T 細胞の表面抗原として 1992 年に石田らによって同定された。その後の解析から、PD-1 は活性化した T 細胞や B 細胞に発現すること。

また、機能不全に陥った CD4⁺ T 細胞に恒常的に発現していることが示されている。さらに、PD-1 はレセプターとしての機能を有しており、2 種類の特異的リガンド (PD-L1 と PD-L2) の存在が明らかにされている。それらリガンドのうち、PD-L1 は多様な細胞に発現が認められるが、PD-L2 は活性化した樹状細胞やマクロファージに発現する。さらに、抗原提示細胞上の PD-L1 の発現は、IFN- γ や TLR リガンド刺激により亢進する。PD-1 シグナル経路の機能解析から、抗原提示細胞が T 細胞に抗原を提示する場合に、PD-1 と PD-1 特異的リガンドの会合は T 細胞に抑制性シグナルを伝達することが示されている。この抑制性シグナルは、末梢組織において自己免疫反応を抑制し、免疫寛容を維持するために重要である。一方、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスや B 型肝炎ウイルスなどの慢性ウイルス感染では、PD-1 を介した抑制性シグナルが抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の活性を抑制するため、病原体の排除を阻害する原因になっていることが示されている。また、BCG に対する感染防御が、PD-1 シグナルを阻害することで増強することが明らかにされている。そこで本研究では、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結核菌に対する防御免疫応答や、BCG ワクチン効果への影響について解析した。さらに最近、IL-1 レセプター欠損マウスおよび MyD88 欠損マウスが結核菌に感受性を示すことが報告され、結核菌に対する感染防御において IL-1 は重要な役割を果たしていると考えられている。また、結核菌感染マクロファージでは、NLRP3 依存的な inflammasome 形成を介して caspase-1 が活性化され、成熟型 IL-1 β 産生が誘導されることが示されている。そこで、結核菌に対する感染防御における inflammasome および caspase-1 活性化の意義を明らかにするため、inflammasome 構成成分である NLRP3、caspase-1、あるいは ASC を欠損したマウスに結核菌を感染させ、その後の感染防御応答について解析した。