

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ヌクレオチド加リン酸分解酵素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。

結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素は、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。これまでに、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素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.)。このことから、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素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、本酵素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結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の基質結合部位を標的としたドッキングシミュレーションを行うことにより、本酵素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、ドッキングシミュレーションは結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤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ドッキングシミュレーション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が、昨年度にドッキングシミュレーションの実験系について再構築を行い、約800万種類の化合物について、期間を大幅に短縮して約半年間で全てのドッキングシミュレーションを行うことができた。その結果、74種類の化合物が新たに結核菌由来新規ヌ

クレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の候補化合物として選択された。そこで本年度は、この74種類の化合物について結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素に対する阻害活性を測定するとともに、結核菌に対して抗菌活性を示す新規化合物の同定を試みた。

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。こ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。そこで本研究課題では、昨年度までに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。そこで本年度は、Rv1509 について精製を行うとともにその酵素活性の測定を試みた。

B. 研究方法

1. 結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤のデザインとその抗菌活性の測定

前年度に行ったドッキングシミュレーションにより、結核菌由来新規ヌクレオチドの基質結合部位に結合することによってその活性を阻害すると予想された74種類の化合物のうち、入手可能であった73種類の化合物について本酵素に対する阻害活性を測定した。基質である diadenosine tetraphosphate を結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素が過リン酸分解することによって生成される ATP の量を市販の

キットを用いて測定することによって活性を評価した。

抗菌活性の測定は、市販の微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) 測定キット (プロズミック MTB-1) を一部改変して使用した。本測定では、キットに付属されている、抗結核薬が分注されているプレートではなく、本研究課題で選択した化合物を分注したプレートを使用した。

2. 結核菌由来 Rv1509 の精製と機能解析

昨年度に作製した、結核菌由来 Rv1509 発現株を用いて、IPTG 誘導により目的の Rv1509 を大量発現させた。超音波処理によって菌体を破碎した後、遠心操作によって不溶性画分を除いた。得られた可溶性画分について HisTag カラムとゲルろ過カラムの 2 種類のカラムを用いた精製を行った。Rv1509 は 1 次構造上のモチーフ解析の結果よりメチルトランスフェラーゼ活性を有することが推測されたことから、精製サンプルの酵素活性を市販のキットを用いて測定した。

倫理面への配慮 本研究は、市販の試薬や器具、及び所属研究機関が保有している菌株やベクター類などを使用して研究を行ったため、相手方の同意・協力を必要とする研究や個人情報の取扱いの配慮を必要とする研究は含まれていない。また、実験計画については所属機関における安全委員会の承認を受けた。大臣確認実験を必要とする組換え DNA 実験については、別途、承認を受けた。

C. 研究結果

1. 結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤のデザインとその抗菌活性の測定

結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤候補として選択した 73 種類の化合物について、実際に本酵素に対する阻害活性の測定を行った。その結果、6 種類の化合物については結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の活性を強く阻害すること、及び 3 種類の化合物につい

ては本酵素の活性を約 50% 阻害することが示された。これまでに得られている阻害活性測定の結果と合わせると、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の候補としてドッキングシミュレーションにより選ばれた 104 種類の化合物のうち、実際に本酵素に対して阻害活性を示した化合物は 15 種類であった。従って、そのヒット率は 14% であった。

次に 15 種類の化合物を用いて結核菌に対する抗菌活性を、微量液体希釈法による MIC 測定で評価した。その結果、15 種類の化合物には著しい抗菌活性は認められなかったが、そのうち 1 種類の化合物 (化合物 1 とする) が高濃度 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在している条件下では結核菌の生育能がコントロールと比較して若干低下していることが示唆された。そこで、この化合物 1 の構造情報を基にして、側鎖などを置換した 4 種類の化合物 (化合物 2 から化合物 5) を入手した。まず、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素に対する阻害活性を測定したところ、化合物 2 は本酵素の活性を約 50% 阻害し、化合物 3 から化合物 5 の 3 種類の化合物は本酵素の活性を強く阻害した (Table 1)。さらに、抗菌活性について結核菌 H37Rv 株を用いて測定した結果、化合物 4 において顕著な抗菌活性が認められた。MIC 値について 6 回の測定を行った結果、中央値と最頻値ともに化合物 4 の MIC 値は 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。さらに、結核菌 H37Ra 株に対する抗菌活性も測定したところ、化合物 4 の MIC 値は 4–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素に対する化合物 4 の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を測定したところ、約 3 μM であり (Fig. 1)、MIC 値 (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ =約 30 μM) と比較して 1/10 以下の値であった。

2. 結核菌由来 Rv1509 の精製と機能解析

結核菌由来 Rv1509 について、2 種類のカラムクロマトグラフィー操作により、SDS-PAGE 上でほぼ単一になるまで精製を行った。市販のキットを用いて Rv1509 の酵素活性を評価したところ、メチルトランスフ

フェラーゼ活性を有することが示唆された。しかしながら、その活性は報告されている他のメチルトランスフェラーゼの活性よりも弱いものであった。また、ゲルろ過カラムの結果から Rv1509 は凝集体をとりやすいことが示された。

D. 考察

本研究課題において、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の候補としてドッキングシミュレーションの結果から選ばれた化合物（104 種類）のうち、実際に本酵素に対して阻害活性を示した化合物のヒット率は 14%であった。このヒット率はこれまでに報告されているドッキングシミュレーションにおけるヒット率と比べて遜色ないものであった。見出した結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の構造情報に基づいて、結核菌に対して抗菌活性を示す新規化合物を同定した。微量液体希釈法による測定結果から、この新規化合物の MIC 値は $32 \mu\text{g/mL}$ であることが示された。この力価は、結核症に対する第一選択薬であるイソニアジドやリファンピシンの力価には及ばないものの、第二選択薬であるカナマイシンやストレプトマイシンに匹敵する力価であると考えられた。今後は、細胞毒性や薬剤耐性結核菌に対する抗菌活性などを測定することによって、新規薬剤の開発につながることを期待される。

結核菌由来 Rv1509 についてメチルトランスフェラーゼ活性が認められたものの、その活性は微弱であった。その原因として、Rv1509 が凝集しやすい性質を持っていることが考えられた。今後、新規薬剤のドラッグデザインを目標とした Rv1509 の機能構造相関解析を進めるためには、Rv1509 の凝集を防ぐ条件の検討が必要であることが示された。

E. 結論

ドッキングシミュレーションと阻害活性の測定結果から、結核菌由来新規ヌクレオチ

ド加リン酸分解酵素の新規阻害剤として 15 種類の化合物を見出した（ヒット率 14%）。

見出した新規阻害剤の構造情報に基づいて結核菌に対して抗菌活性を示す新規化合物を同定した（MIC 値は $32 \mu\text{g/mL}$ ）。

結核菌由来 Rv1509 がメチルトランスフェラーゼ活性を有することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y. Arakawa, and K. Shibayama. 2014. Roles of Ala-149 in the catalytic activity of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Biosci. Biotechnol. Biochem., in press.
 - 2) Kim, H., K. Shibayama, E. Rimbara, and S. Mori. 2014. Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. PLOS ONE, 9(6):e100062.
2. 学会発表
 - 1) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y. Arakawa, and K. Shibayama. Molecular characterization of nicotinate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and inhibition of its activity by pyrazinoic acid. FEBS-EMBO 2014. 30 August-4 September, 2014, Paris, France.

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

Table 1 阻害活性の測定

化合物名	活性比*
1	0%
2	49%
3	0%
4	0%
5	0%

*0.1mMの基質存在下での酵素活性を100%とした時

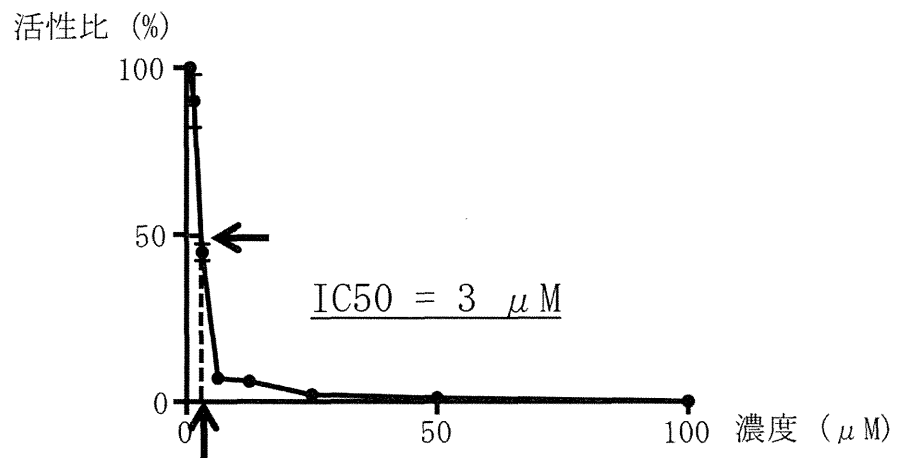


Fig. 1 化合物4における結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素に対するIC50値

平成26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 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

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・再興感染症研究事業(新興・再興
感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業))
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.

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。結核菌分泌タンパクである Ag85B はこのタンパクのみで結核菌排除に有効な Th1 免疫応答を強力に誘導することが知られている。そこで、新たな追加免疫法の開発戦略を得るために、Ag85B の Th1 免疫応答誘導機序を解析した結果、これまでの *in vivo* 解析から Ag85B のヘルパーエプトープとして同定した Peptide-25 が①マウス生体内で選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できる Th1 分化誘導ペプチドであり、同じ場所に免疫した蛋白抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性を増強する作用を有していること、さらに *in vitro* 解析から② 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 の発現を伴うエフェクターメモリー様 CTL (転写抑制因子 Blimp1 陽性、Bcl-6 陰性) の分化を誘導すること、③この樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって誘導される Th1 細胞、Th17 細胞とは異なるレジデントメモリー様 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。本年度はエフェクターメモリー様 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 のマウス生体内での役割及び追加免疫における IL-17F の効果を明らかにすることを目的とした。その結果、Peptide-25 によるエフェクターメモリー様 CTL の活性増強には IL-17F が必須であり、IL-17F 産生を効果的に誘導できる Peptide-25 のみで BCG ワクチンに対するブースト効果が誘導できる可能性が示された。さらに、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り、より効果的な追加免疫法の開発にはこの共因子を同定することが必要であることが示唆された。

A. 研究目的

BCG は結核防御に有効な Th1 免疫応答を惹起することで感染に備える結核予防ワクチンであるが、その効果は限定的である。さらに、BCG は有効期間が短く、成人に接種しても予防効果は極めて低いという問題点がある。したがって成人に有効な追加

免疫法を開発することは急務である。

マウスを用いた我々のこれまでの解析では、結核菌が感染した個体は結核菌特異的防御反応の始動が遅く、感染 2 週後にやっと所属リンパ節において CD4 T 細胞の活性化が認められる。この間、自然免疫による防御だけでは結核菌は排除されず、およ

そ 20,000 倍まで増殖する。しかし、活性化した CD4 T 細胞が感染局所に到達すると、その後の結核菌数はほぼ一定となる。このことは、結核菌体自身が誘導する防御反応が結核菌を十分に排除し得ることを示している。

結核菌の分泌タンパクである Ag85B はこのタンパクのみで Th1 免疫応答を強力に誘導することが知られている。そこで、結核菌の排除に有効な防御反応を誘導する結核菌体成分として Ag85B に着目し解析を行ない、マウスヘルパーエпитープとして 15 個のアミノ酸からなる Peptide-25 (アミノ酸配列: FQDAYNAAGGHNAVF) を同定した。

さらにこの Peptide-25 の特性を解析した結果、Peptide-25 はマウス生体内で選択的かつ強力に Th1 免疫応答を誘導できる Th1 ペプチドであり、同じ場所に免疫した蛋白抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) の障害活性を増強する作用を有していた。

そこで、新たな追加免疫法の開発戦略を得るために、Peptide-25 による CTL 活性増強作用を Peptide-25 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マウス (P25 TCR-Tg)、卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1) 及び正常マウス由来の樹状細胞を用いた *in vitro* CTL 分化誘導実験系を用いて解析した。その結果、① 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ナザイム B の発現を伴うエフェクターメモリー様 CTL (転写抑制因子 Blimp1 陽性、Bcl-6 陰性) の分化を誘導すること、② この樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって誘導される Th1 細胞、Th17 細胞とは異なるレジデントメモリー様 (CD44 強陽性、CD62L 弱陽性) 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が明らかになった。

本年度はエフェクターメモリー様 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 のマウス生体内での役割及び追加免疫における IL-17F の効果を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) エフェクターメモリー様 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 または OVA のみをフロイント不完全アジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウス (日本クレア: 8 週齢) 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: 8 週齢) の背部皮下に免疫した。

免疫 4 週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* で培養した後、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。

(2) 追加免疫における IL-17F の効果の検証

C57BL/6 マウス (5 週齢) の背部皮下に BCG-Tokyo 株を接種し、6 週後に Peptide-25 を経静脈投与した。

Peptide-25 投与 4 週後に結核菌 H37Rv 株を Glas-Col 社の噴霧感染装置 (Model 099C A4212) を用いて感染させた。

感染 4 週後にマウスをイソフルラン過麻酔により安楽殺し、肺及び脾臓を採取した。肺及び脾臓をそれぞれ培地に懸濁して、結核菌 H37Rv 株の感染価をコロニーアッセイで算出した。

(3) IL-17F による樹状細胞成熟化誘導機序の解析

P25 TCR-Tg 脾臓細胞より CD4 T 細胞 (P25-CD4 T 細胞) を、OT-1 脾臓細胞より CD8 T 細胞 (OT1-CD8 T 細胞) を、C57BL/6 マウス脾臓細胞より樹状細胞を調製した。

エフェクターメモリー様 CTL の分化を誘導できる樹状細胞の成熟化における IL-17F の役割を検討するために、樹状細胞を Peptide-25 または TCR に対して低親和性であり、Th2 免疫応答を誘導する活性を有している Peptide-25 変異体 APL:G248A

(FQDAYNAAAGHNAVF) 及び OVA 存在下に P25-CD4 T 細胞と共培養する際にリコンビナント(r)IL-17F を添加した。培養 1 日後の OVA を取り込んだ樹状細胞上の IL-17 受容体(R)A 鎖、CD70、H-2D^b、H-2K^b の発現量を FACS にて、IL-17RB 鎖の発現量を Real-Time PCR 法にて定量した。

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) エフェクターメモリー様 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

これまでの *in vitro* 実験系の解析から 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 特異的エフェクターメモリー様 CTL の分化頻度が低下することを明らかにしている。

そこで、Peptide-25 によるエフェクターメモリー様 CTL 分化誘導におけるマウス生体内での IL-17F の役割に関して IL-17F 欠損マウスを用いて検討した。Peptide-25 と OVA または OVA のみをフロイント不完全アジュバントに懸濁し、IL-17F 欠損マウスに皮下接種し、4 週後の 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。その結果、OVA 単独免疫によって誘導される OVA 特異的 CTL 活性は正常マウスに比べ IL-17F 欠損マウスでは有意に低下していた。さらに正常マウスで見られる Peptide-25 による OVA 特異的 CTL 活性の増強効果は IL-17F 欠損マウスでは完全に消失していた。

(2) 追加免疫における IL-17F の効果の検証

これまでの *in vitro* 実験系の解析から P25-CD4 T 細胞を Peptide-25 及び OVA 存在下に樹状細胞と共培養すると、CD4 T 細胞は Th1 細胞と IL-17F を産生する CD4 T 細胞(IL-17A は産生しないことから Th17 細胞とは異なる亜集団であると推測される)へと効率良く分化すること、この IL-17F 産

生細胞が皮膚などの上皮や肺気道などの末梢組織に多く存在するレジデントメモリー様の Phenotype を有していることを明らかにしてきた。したがって、IL-17F 産生レジデントメモリー様 CD4 T 細胞の分化を結核菌感染前に誘導できれば、結核菌感染後の肺において結核菌が感染した樹状細胞と相互作用し、機能的 CTL 分化を誘導する樹状細胞の成熟化を促進できる可能性が考えられた。

そこで、BCG ワクチンの対する追加免疫としての Peptide-25 の効果を検討した。C57BL/6 マウスの背部皮下に BCG-Tokyo 株を接種し、6 週後に Peptide-25 を経静脈投与し、4 週後に結核菌 H37Rv 株を噴霧感染させた。感染 4 週後の肺及び脾臓の結核菌の感染価をコロニーアッセイで算出した結果、脾臓では BCG 単独接種に比べ BCG に対する追加免疫として Peptide-25 を投与しても結核菌の増殖抑制効果には有意な差は認められなかった。一方、感染局所である肺では BCG 単独接種に比べ Peptide-25 の追加免疫によって結核菌の増殖抑制効果が増強される傾向が示された。

(3) IL-17F による樹状細胞成熟化誘導機序の解析

本年度の解析から IL-17F が結核菌の排除に有効な防御反応の誘導に生体内でも機能し得る可能性が示された。そこで、IL-17F による樹状細胞の成熟化誘導機序に関して *in vitro* 実験系で解析した。これまでの解析から IL-17F 産生 CD4 T 細胞の分化を誘導できない APL での刺激系に rIL-17F を加えてもグランザイム B を産生できるエフェクターメモリー様 CTL の分化は誘導できないことから、Peptide-25 を介して CD4 T 細胞と相互作用した樹状細胞のみが機能的 IL-17F 受容体を発現している可能性が考えられた。そこで、樹状細胞を Peptide-25 または APL 及び OVA 存在下に P25-CD4 T 細胞と共培養する際に rIL-17F を添加し、1 日後の樹状細胞上の IL-17RA 鎖及び B 鎖の発現量を定量した。その結果、いずれのペプチドを用いても A 鎖、B 鎖共に同程度発現していることが明らかとな

った。

さらに樹状細胞の成熟化の程度の指標である CD70、抗原提示能の指標である H-2D^b、H-2K^b の細胞表面発現量を比較検討した結果、Peptide-25 と APL 間、Peptide-25 と Peptide-25+rIL-17F 間で有意な差は認められなかった。

D. 考察

CTL 分化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割を IL-17F 欠損マウスを用いて検討した。その結果、Peptide-25 が誘導する OVA 特異的 CTL 活性の増強効果は IL-17F 欠損マウスでは完全に消失していた。さらに OVA 単独免疫で誘導される OVA 特異的 CTL 活性は野生型に比べ IL-17F 欠損マウスにおいて有意に減弱していた。この事実は機能的 CTL への分化誘導における IL-17F の作用は結核菌体成分である Peptide-25 に特異的な現象ではなく、一般的な蛋白抗原における免疫応答においても IL-17F が重要な役割を果たしていることを示している。

レジデントメモリー T 細胞は皮膚などの上皮や肺気道などの末梢組織に多く存在することが報告されている。*in vitro* 実験系による解析から、Peptide-25 はレジデントメモリー様の IL-17F 産生 CD4 T 細胞の分化を誘導する。この IL-17F 産生 CD4 T 細胞との相互作用によって成熟化した樹状細胞はグランザイム B を産生するエフェクターメモリー様 CTL の分化を誘導する。したがって、マウス生体内において Peptide-25 が *in vitro* と同様の作用を発揮できれば、結核菌感染直後の肺において結核菌に感染した樹状細胞がレジデントメモリー様 IL-17F 産生細胞と相互作用することで成熟化し、その結果 BCG ワクチンで誘導された結核菌特異的メモリー CTL の再活性化を増強できる可能性が考えられた。そこで、BCG ワクチンに対する追加免疫としての Peptide-25 の効果を検証した結果、2 次リンパ組織である脾臓では Peptide-25 の追加免疫効果は認められないものの、感染局所である肺においては結

核菌排除機能が増強される傾向が示された。この事実は追加免疫として投与された Peptide-25 が生体内でもレジデントメモリー様の IL-17F 産生細胞の分化を誘導していることを示唆している。今回の解析では BCG ワクチンから Peptide-25 追加免疫までの間隔が 6 週間と短く、BCG ワクチンで誘導された残存する結核菌特異的メモリー CTL が IL-17F で成熟化した樹状細胞と相互作用することで細胞障害活性の増強もしくは増殖能が亢進し、結核菌の排除機能が亢進したと考えられる。BCG は有効期間が短く、成人に接種しても予防効果は極めて低いという事実から、BCG によって誘導される結核菌特異的メモリー CTL の分化誘導効率もしくは残存率が低いことは容易に推測できる。したがって、成人に適応する追加免疫法としては IL-17F 産生レジデントメモリー T 細胞の分化を誘導するシステムに結核菌特異的 CTL 抗原を共存させる必要がある。

APL 及び P25-CD4 T 細胞との共培養でも CD70 の発現量を指標とした場合には Peptide-25 と同程度の樹状細胞の成熟化が誘導される。さらに CTL に対する樹状細胞の抗原提示能に重要な H-2D^b 及び H-2K^b の発現量、IL-17RA 鎖及び B 鎖の発現量共に APL と Peptide-25 間では有意な差は認められない。しかしながら APL 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と確信する。

E. 結論

本年度の研究から、Peptide-25 によるエフェクターメモリー様 CTL の活性増強には IL-17F が必須であり、IL-17F 産生を効果的に誘導できる Peptide-25 のみで BCG ワクチンに対するブースト効果が誘導できる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 2014. Polyclonal activation of naive T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, Cys0 and major membrane protein-II. BMC Infect. Dis. 14: 179.

2. 学会発表

- 1) 田村敏生, 下袴田陽子, 前田百美, 牧野正彦. 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. 第87回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014年9月 所沢市
- 2) 前田百美, 田村敏生, 向井徹, 福富康夫, 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の miRNA 解析. 第87回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014年9月 所沢市
- 3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Umemura. Effect of Peptide-25 of Ag85B on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T

lymphocytes. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市

- 4) Shimohakamada, Y., and T. Tamura. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市
- 5) Tsukamoto, Y., and T. Tamura. Functional improvement of *Mycobacterium bovis* BCG as a vaccine against tuberculosis. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市
- 6) Umemura, M., M. Fukui, M. Yamasaki, C. Fukui, S. Nakae, T. Tamura, and G. Matsuzaki. Involvement of IL-33 in the protective immunity against lung mycobacterial infection. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|-------------------------|
| 1. 特許取得 | 出願中
(特願 2014-241429) |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

平成26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 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

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・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
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・細菌学分野・教授）

研究要旨.

2013年に150万人が結核で死亡したことが報告されているように、結核は現在も脅威的な細菌感染症であり、BCGを凌ぐ効果的なワクチン開発が、急務の課題である。結核菌の病原性と宿主免疫応答の双方を理解することが、ワクチン開発に繋がる。今回、結核肉芽腫において、宿主分子 hypoxia inducible factor 1 (HIF1) の産生が顕著であることを見だし、結核病態における役割を解析した。その結果、HIF1はマクロファージで結核菌感染により誘導され、ワクチン免疫の主要なサイトカインである IFN-gamma 刺激で誘導され感染結核菌の排除を担う iNOS の産生に関わることを明らかにした。本研究から、宿主分子 HIF1 の産生を誘導することが、ワクチン戦略において重要であることが判明した。

A. 研究目的

結核のワクチン開発にむけて、結核菌の病原機構に加え、宿主側の抗結核防御メカニズムの解明も充分でない。獲得免疫の本体である CD4 T 陽性や CD8 T 陽性細胞に加え、結核菌の潜伏感染細胞であり、またその活性化により菌の殺傷を担うマクロファージも宿主防御を担う細胞である。T 細胞の活性化とマクロファージの集積の結果生じる肉芽腫は、宿主防御の要であり、内部は低酸素化し好気性である結核菌の増殖抑制に寄与する。

私達は、ヒト結核肉芽腫に結核菌の増殖停止を促す結核菌分子 Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の産生が旺盛であることが示したが、昨今、MDP1 をマウスやモルモットなどに免疫することで、強い結核菌感染防御が誘導されることが示されており、MDP1 は、重要な結核ワクチン候補分子であることが示されている。

一方、我々は最近、MDP1 が発現する結核肉芽腫に、低酸素に応答する宿主転写因子 hypoxia inducible factor 1 (HIF1) の産生

が顕著であることを発見した。本研究では、HIF1 の結核病態における役割を解析した結果、マクロファージに発現する HIF1 は、結核菌感染防御に関わることで、その機構の一旦は、マクロファージからの抗菌性蛋白質の発現誘導であることを見いだした。

B. 研究方法

マウスと感染.

BALB/c マウス、および C57BL/6 マウスは、日本 SLC より購入した。HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$ マウスおよび LyzM-Cre $^{+/+}$ マウスは、米国ジャクソン研究所から購入した。両マウスを掛け合わせ、HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$ -LyzM-Cre $^{+/-}$ マウスを作成し、実験に試供した。iNOS ノックアウトマウスは、大阪市立大学大学院医学研究科 泉 康雄 博士より供与いただいた。

結核菌 H37Rv 株を、噴霧感染によりマウス肺あたり 10 CFU となるように噴霧感染させた。5 週間後、マウス肺を摘出し、ホルマリン固定後、ヘマトキシジン・エオジン (HE) 染色、抗酸性染色、抗 MDP1 抗体と抗 HIF1 抗体による免疫染色を行った。MDP1 抗体は、

ウサギに MDP1 に二度免疫し得られた血清を硫酸沈殿して生理食塩水で透析したものをを用いた。HIF1 抗体は、サンタクルズ社より購入した。また 2×10^6 CFU を麻酔した C57BL/6 野生マウス、HIF1-CKO マウスに気道より直接感染させ、経時的に死亡率を観察した。

骨髓由来マクロファージを用いた試験。マウス骨髓細胞をフラッシングにより採取し、MCF を分泌する L929 ファイブロブラスト細胞の上清を加えた DMEM 培地で 7-10 日間培養しマクロファージに分化させた。分化マクロファージを 2×10^6 細胞/穴となるように 6 穴プレートに再播種し、結核菌 H37Rv 株を MOI : 0.5、BCG を MOI : 2 で 12 時間感染させた。非感染菌を洗浄で除いた後、一部の細胞は、500 U/ml の組み換えマウス IFN- γ で刺激した。

Real Time PCR とウエスタンブロット。

感染細胞より、PARIS™ キットを用いて RNA を 1 μ g 抽出した。ReverTra Ace® qPCR RT キットにて cDNA に変換し、18S rRNA を対照として、iNOS, LRG-47 遺伝子の転写量を、7500 Fast Real-Time PCR System により解析した。蛋白質発現の解析のため、感染培養マクロファージをセルスクレーパーにて採取し、可溶化後、10-20%のグラジエントゲルにて蛋白質を展開し、PVDF 膜に転写した後、抗 iNOS 抗体および抗 β -actin 抗体でウエスタンブロットを行い、蛋白質発現を検出した。

倫理面への配慮 本研究は該当しない。

C. 研究結果

結核肉芽腫における、MDP1 と HIF1 の発現。

結核菌を噴霧感染したマウスの肺を抽出し、ヘマトキシジン・エオジン (HE) 染色、抗酸性染色、抗 MDP1 抗体と抗 HIF1 抗体による免疫染色を行った。その結果、HE 染色で濃染する肉芽腫の中央部に、抗酸性染色陽性部位が点在し、同部位を抗 MDP1 抗体と抗 HIF1 抗体が顕著に認識することが分かった。MDP1 と HIF1 の局在の一致は、抗酸菌染色とそれぞれよりも高い傾向が観察さ

れた。以上の結果から、マウス結核肉芽腫において、結核菌の増殖抑止分子である MDP1 と宿主分子 HIF1 の発現部位に一致が認められた。

結核菌感染によって HIF1 の安定化と発現が生じる。

マウス肉芽腫は、ヒトの結核肉芽腫に比べ、酸素分圧が高い。HIF1 の発現が、低酸素による生じたものであるかを検討するため、低酸素プローブを結核菌感染マウスに静脈注入し肺肉芽腫への集積を観察したが、集積は認められなかった。

そこで、マウス骨髓由来マクロファージを試験管内で培養し、結核菌を感染させることで HIF1 量が上昇するかを検討した。HIF1 は、HIF1- α と HIF1- β のヘテロダイマーである。常酸素下において、HIF1- α はユビキチン化によって分解されているが、低酸素下で分解を免れ安定する。我々は本試験において、酸素濃度に依存せず、結核菌の感染自体で、HIF1- α の安定化と、転写レベルでの発現増強の双方が生じることを明らかにした。

HIF1-CKO マウスは、結核菌感染に感受性を示す。

マクロファージに発現する HIF1 の結核菌感染における役割を解析するため、マクロファージで発現が誘導される LyzM プロモーターを利用した HIF1- α コンディショナルノックアウトマウス (HIF1-CKO マウス) を利用して、HIF1 の結核菌感染に対する役割をマウス個体レベルで解析した。HIF1-CKO マウスに結核菌を尾部静脈より感染させ生存率を検討した結果、野生型マウスに比べ、有意に死亡率が上昇することが判明した。

HIF1 は、IFN- γ 存在下で、一酸化窒素合成酵素の産生を誘導する。

マウス個体レベルでマクロファージに発現する HIF1 が、結核防御に重要な役割を果たすことが判明した。その防御メカニズムを明らかにするため、試験管内で培養した HIF1-CKO マウス由来マクロファージに結核菌を感染させ、結核菌の増殖を野生マウス由来マクロファージに感染させたときと比

較した。その結果、特に IFN- γ 刺激によって野生マウスマクロファージでは、結核菌の増殖抑制が生じるのに対して、HIF1-CKO マウス由来マクロファージにおいては、それが有意に低下することが分かった。

IFN- γ は、特に、iNOS と LRG-47 の誘導によって、マウスマクロファージを活性化し、結核菌の殺傷機構を誘導することが知られている。前者は、Reactive nitrogen intermediates を後者は、オートファジーを誘導する。HIF1-CKO マウス由来マクロファージに結核菌を感染させ、IFN- γ で刺激した後に、iNOS と LRG-47 の転写レベルを検討した結果、iNOS の発現が顕著に抑制されていることが判明した。iNOS の発現は、ウエスタンブロット法でも確認し、HIF1-CKO マウス由来マクロファージにおいて翻訳レベルでも減少していることを明らかにした。

上記の結果から、結核菌が感染して HIF1 が安定化・発現することが、IFN- γ 刺激マクロファージにおける iNOS 発現の効率化に必要であることが判明した。

D. 考察

ワクチンの開発に向けて、具体的な開発を進めるとともに、結核菌の病原性と宿主免疫応答の双方を理解する必要がある。成人結核の多くは、無症候潜伏感染からの再燃であるため、潜伏感染時に産生される結核菌の抗原性分子や発症を抑止する宿主免疫応答を利用することがワクチン開発に繋がると考えられる。

研究分担者は、日本 BCG 製造株式会社や国立感染症研究所との共同研究で、これまで結核菌の生存に必須の DNA 結合性蛋白質で、菌の増殖制御を担う MDP1 がヒト結核肉芽腫において顕著産生されており、ワクチン候補分子であることを明らかにしている。今回、MDP1 が発現するマウス結核肉芽腫において、宿主分子 HIF1 の産生が顕著であることを見だし、結核病態における役割を解析した。

MDP1 と HIF1 の局在は、それぞれと抗酸性染色部位との局在以上に、一致率が高か

った。これは、抗酸菌染色では、細胞壁合成の低下した休眠菌が染色されにくいこと、また、MDP1 や HIF1 とともに、鉄欠乏状態で結核菌と宿主細胞からそれぞれ産生されることによると考えることができる。また、本研究で明らかにしたように、HIF1 は、宿主防御を担う分子であることから、HIF1 発現部位では、マクロファージが十分に活性化され、結核菌は増殖を停止、すなわち MDP1 の発現が増強されている可能性がある。

HIF1 は、様々な宿主細胞において、低酸素応答を担う転写因子で、HIF1-KO マウスは胎生致死である。したがって本研究では、結核菌感染マクロファージにおける HIF1 の役割を解析するため、マクロファージで HIF1 が欠損する CKO マウスを利用して解析を行った。その結果、HIF1-CKO マウスは、結核菌に高感受性をしめし、試験管内では、特に IFN- γ 刺激で生じる結核菌の細胞内増殖抑制が生じないことが判明した。つまり HIF1 は、宿主の防御的ワクチン免疫において重要な分子であることが推定された。

IFN- γ 刺激マウスマクロファージの殺菌機構は、iNOS もしくは LRG-47 によって主に担われている。そこで、HIF1-CKO マウスにおける両分子の産生を検討した結果、iNOS の産生が顕著に低下していることが判明した。この結果から、HIF1 によってもたらされる防御効果の一因は、IFN- γ 刺激後の iNOS の誘導であることが推定された。

一方、ヒトマクロファージでは、IFN- γ 刺激後、iNOS の発現誘導は乏しく、HIF1 が、ヒトにおいても結核菌感染に対して防御的役割を担うかは、今後の検討課題である。また、HIF1 は、iNOS 以外にも、多数の遺伝子発現を調節するため、未知の抗菌メカニズムを誘導している可能性もある。研究を継続し、これらの課題を解決し、ワクチン開発に繋がりたい。

E. 結論

HIF1 は、結核菌感染マクロファージで産生・安定化が促進される。IFN- γ は、結核菌感染に対して T 細胞から産生されマクロファージを活性化することで、宿主防御に

主要な役割を果たすサイトカインである。本研究から HIF1 は、IFN- γ 刺激マクロファージの殺菌機構に関与し、少なくともマウスマクロファージで iNOS を誘導し、宿主防御応答を担うことを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Ohtsuka, K., H. Ohnishi, E. Nozaki, J. Pais Ramos, E. Tortoli, S. Yonetani, S. Matsushima, Y. Tateishi, S. Matsumoto, and T. Watanabe. 2014. Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium kyorinense*. Genome Announc. 2: e01062-01014.
 - 2) Nishiuchi, Y., A. Tamaru, Y. Suzuki, S. Kitada, R. Maekura, Y. Tateishi, M. Niki, H. Ogura, and S. Matsumoto. 2014. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health. 12: 211-219.
 - 3) Fujii, Y., S. Kaneko, S. M. Nzou, M. Mwau, S. M. Njenga, C. Tanigawa, J. Kimotho, A. W. Mwangi, I. Kiche, S. Matsumoto, M. Niki, M. Osada-Oka, Y. Ichinose, M. Inoue, M. Itoh, H. Tachibana, K. Ishii, T. Tsuboi, L. M. Yoshida, D. Mondal, R. Haque, S. Hamano, M. Changoma, T. Hoshi, K. Kamo, M. Karama, M. Miura, and K. Hirayama. 2014. Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. PLoS Negl Trop Dis. 8: e3040.
 2. 学会発表
 - 1) 戸谷孝洋, 西内由紀子, 北中博美, 金子幸弘, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィーム形成時の特徴. 第 28 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 2014 年 7 月 東京
 - 2) Niki, M., M. Niki, M. Osada-Oka, Y. Ozeki, and S. Matsumoto. BAM-PTH1073-Mycobacterial DNA-binding protein 1 induces phenotypic tolerance to isoniazid in mycobacteria. International Union of Microbiological Societies Congresses. 27th July-1st August, 2014 Montreal, Canada
 - 3) 松本壮吉. 結核菌の増殖抑制や潜在結核菌の解析および、結核ワクチンの開発研究. 第 22 回呼吸器疾患・感染症研究会. 2014 年 8 月 東京
 - 4) 松本壮吉, 尾関百合子. 成人の肺結核予防を目指した、新しい結核ワクチンの開発研究. 中部乳酸菌研究会発表会. 2014 年 11 月 長野市
 - 5) 前山順一, 山崎利雄, 山本十糸子, 林大介, 尾関百合子, 松本壮吉, 伊保澄子, 山本三郎. TLR9 リガンドである G9.1 をアジュバントとして用いた結核ブラスターワクチンの開発. 日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 福岡市
 - 6) 藤川健弥, 北田清悟, 松本壮吉, 前倉亮治. LTBI 症例における血清抗体を用いた前発病状態の検出. 第 90 回日本結核病学会. 2015 年 3 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26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 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

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・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
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に関する研究

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.

BCG 接種 4 週目以降に結核菌を経鼻感染させたマウスの肺における Th1 型サイトカインやケモカイン産生量は、結核菌のみを感染させたマウスのそれらよりも弱かった。この結果は、BCG 接種により強い防御免疫が出現するが、その制御に関わる抑制機序も誘導されることを示すものである。そこで、抗原特異的 T 細胞からの IFN- γ 産生を指標にして、この制御機序について検討した。その結果、PD-1 シグナル経路はエフェクターおよびエフェクターメモリー T 細胞からの IFN- γ 産生を抑制する強い効果を発揮することが示された。また、セントラルメモリーからエフェクター T 細胞への分化制御には、PD-1 よりも Tim3 経路が重要な役割を果たすことが示された。

A. 研究目的

PD-1 は CD28/B7 ファミリーに属する分子で、T 細胞や B 細胞では活性化後にその発現が誘導されるため、活性化マーカーに位置づけられている。また、機能不全に陥った T 細胞では PD-1 が恒常的に発現していることが報告されている。PD-1 はシグナルレセプターとして機能する。抗原提示細胞上の特異的リガンド (PD-L1 と PD-L2) と会合することで、T 細胞抗原レセプターや CD28 共刺激分子を介するシグナル伝達を抑制することが示されている。また、PD-1 欠損マウスが重篤な自己免疫病やアレルギー症状を示すことから、この PD-1 を介した抑制性シグナルは、末梢性免疫寛容の誘導に重要な役割を果たすことが明らかにされている。一方、慢性ウイルス感染や抗腫瘍免疫では、PD-1 を介した抑制性シグナルが病原体や腫瘍細胞の排除を阻害してしまう。この場合、PD-1 経路を阻害して抗原特異的 T 細胞の機能制御を解除することにより抗ウイルス活性や抗腫瘍活性が亢進することが示されている。

結核菌は宿主に感染後速やかに肺、脾臓、

および肝臓に到達し、食細胞の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感染細胞内で増殖する。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。また、それが引き金となって結核菌に特異的な Th1 型 CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞が誘導され、結核菌に対する強い獲得抵抗性が発現する。結核菌特異的 T 細胞は抗原刺激に反応して IFN- γ や TNF- α などの Th1 型サイトカインを大量に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 perforin や granzyme を産生することにより細胞内の菌を殺菌すると共に、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感染防御応答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し、空洞化するのはこのためである。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になる。これまでの PD-1 欠損マウスを用いた解析から、結核菌の感染初期に PD-1 を介した抑制経路が働かないと組織傷害を伴う過剰な免疫応答が誘導され、菌の増殖を制御できなくなることがわかっている。一方、BCG に対する感染防御は PD-1 欠損マウスで持続的に強く誘導されることが明らかになった。この結果は、BCG ワクチン効果が PD-1 シグナル経路の阻害により増強することを示唆している。しかし、抗 PD-1 抗体を用いて PD-1 シグナル経路を阻害しても、BCG ワクチン効果の増強は今のところ認められていない。そこで、BCG 特異的 T 細胞の IFN- γ 産生能を指標にして、BCG 接種により誘導される免疫制御機序の詳細について解析した。

B. 研究方法

感染実験

C57BL/6 野生型マウスに BCG (10^4 cfu) を皮下接種した。その 4 週後に、結核菌 (10^3 cfu) を経鼻感染させ、感染 2 および 4 週後に肺を回収した。また、C57BL/6 野生型マウスに直接結核菌を感染させ、2 および 4 週後に肺を回収した。肺ホモジネートをそれぞれ作製し、遠心分離後に回収した上清中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-12/23p40、IL-17A、IL-6、IL-10、MCP-1 (CCL2)、RANTES (CCL5)、KC (CXCL1)、MIP-1 α (CCL3)、MCP-3 (CCL7)、および IP-10 (CXCL10) 産生量を ELISA 法で測定した。

IFN- γ 産生応答

C57BL/6 野生型マウスに BCG (10^4 cfu) を皮下接種し、8 週後に脾臓を回収した。赤血球を破壊した後、脾細胞懸濁液 (5×10^6 cells/ml) を調整し、24 穴培養プレートに加えた (1ml/well)。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R1、PD-1、C3、Tim-3、CTLA-4、または IFN- α/β に対する中和抗体存在下に PPD (1 μ g/ml) で 2 日間刺激し、培養上清を回収した。培養上清中の IFN- γ 産生量は ELISA で測定した。さらに別の実験では、BCG 接種 8 週後のマウスより回収した脾細胞を各種抗体存在下に PPD で 7 日間刺激した。生細胞を回収し、

正常マウス脾細胞から得た抗原提示細胞を加えた後 PPD でさらに 2 日間刺激した。培養上清を回収し、IFN- γ 産生量を測定した。

倫理面への配慮 本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

BCG で誘導される感染防御の制御

正常マウスに結核菌を経鼻感染させると、4 週後の肺では強い炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-17A、TNF- α 、IL-6 および IL-12/23p40) およびケモカイン (MCP-1、RANTES、KC、MIP-1 α 、MCP-3、および IP-10) 産生が誘導された。しかし、抑制性サイトカインである IL-10 の産生は認められなかった。一方、BCG 接種後 4 週間経ったマウスに結核菌を感染させた場合、結核菌感染 2 週間後にはサイトカインおよびケモカイン産生が誘導された。しかし、結核菌感染 4 週間後では、多くのサイトカインおよびケモカイン産生レベルが正常マウスで見られたレベル以下であった。例外として、BCG 接種群の IL-6 は正常マウスと同様に強い産生を示した。この結果は、BCG 接種により強い防御免疫が出現するが、それと同時に免疫応答の制御に関わる抑制性機序も誘導されることが示された。

BCG で誘導される感染防御の制御機序の解析

BCG 接種後に誘導される T 細胞機能制御のメカニズムを解析するため、マウスに BCG を接種し、8 週後の免疫制御機序が誘導されている時期の脾 T 細胞を *in vitro* で PPD 刺激した。その際、各種抑制経路の阻害抗体を添加して、どのような制御機序が関与しているのかを IFN- γ 産生量を指標にして調べた。その結果、脾 T 細胞を PPD で 2 日間刺激することにより BCG に特異的なエフェクターおよびエフェクターメモリー T 細胞の機能を調べたところ、IL-1 α 、IL-1 β や IL-1R1 に対する抗体の影響を受けなかった。また、抑制性シグナル分子として知られる CTLA-4 や Tim-3 に対する抗体の処理

によっても IFN- γ 産生に変化は認められなかった。一方、抗 PD-1 抗体を添加した場合には著明な IFN- γ 産生の増強が認められた。従って、PD-1 シグナル経路はエフェクター細胞の機能を抑制することで BCG 感染後期の免疫制御に関与することが示された。さらに、セントラルメモリーからエフェクター T 細胞への分化に対する影響を調べるため、BCG 感作した脾 T 細胞を各種抗体存在下に PPD で 7 日間刺激して T 細胞分化を誘導し、PPD の 2 次刺激に対する IFN- γ 産生応答を解析した。その結果、抗 PD-1 抗体処理は T 細胞の分化に影響を及ぼさなかったが、抗 Tim-3 抗体により IFN- γ 産生が有意に増強されることが示された。一方、C3 および I 型 IFN に対する抗体で処理した場合に IFN- γ 産生が抑制されたことから、これらを介したシグナル経路が BCG 感染後期の T 細胞分化に関与することが示された。

D. 考察

マウスに BCG を接種すると 3 週間後には強い防御免疫が誘導されるが、6 週目以降では菌が臓器内にまだ存在するにも拘らず T 細胞機能の明らかな低下が認められる。これまでに成人結核に対して BCG ワクチンがその効果を発揮できないことが示されているが、その原因の一つが BCG 接種後に誘導されるこの抑制性機序によることが考えられ、この機序を阻害、あるいは適切にコントロールすることで BCG のワクチン効果を増強できることが期待される。この免疫抑制機序を *ex vivo* の実験系を用いて解析したところ、BCG 接種 8 週間後では PD-1 を介した抑制性シグナル経路が T 細胞のエフェクター機能を抑制していることが明らかになった。これまでに慢性ウイルス感染や腫瘍免疫において抗 PD-1 抗体処理により宿主の抵抗性が著明に増強することが示されている。BCG 感染においても PD-1 欠損マウス由来 T 細胞のサイトカイン産生が正常マウス由来の T 細胞よりも強く誘導されることがわかっている。しかし、PD-1 欠損マウスに BCG 接種してもそれによる感染防御の誘導は限定的であったことから、BCG 感染

の場合、防御免疫の制御機序には PD-1 以外のシグナル経路も関与することが示唆される。そこで、エフェクター T 細胞への分化誘導への影響を解析した。その結果、抗 PD-1 抗体は T 細胞分化に影響を及ぼさなかったが、Tim-3 経路を阻害することにより IFN- γ 産生の明らかな増加が認められた。Tim-3 は PD-1 と同様にエフェクターや機能不全に陥った T 細胞に発現することが示されている。また、T 細胞上に発現した Tim-3 にそのリガンドである galectin9 が会合すると、T 細胞機能が抑制され、アポトーシスやトランスの状態に陥ることが報告されている。この結果から、BCG 接種により発現する T 細胞機能の制御には Tim3 を介した T 細胞分化の抑制作用が重要であることが示された。一方、抗 C3 抗体を培養系に加える事により、T 細胞分化が抑制されることが示された。最近、活性化 T 細胞が C3 成分を産生することが報告されている。T 細胞から産生された C3 は C3b に変換された後、抗原と結合して抗原をオプソニン化する。オプソニン化された抗原は T 細胞抗原レセプターによって認識され、同時に C3b は T 細胞表面の CD46 分子に結合してその下流のシグナル経路を活性化する。この C3b と CD46 の結合は、Th1 細胞の増殖やサイトカイン産生応答に重要な役割を果たすことが示されている。これらのことから、C3-CD46 を介したシグナルが BCG 接種後に誘導される T 細胞の分化誘導に重要であることが示された。また、本研究では抗 IFN- α/β 抗体処理によりエフェクター T 細胞への分化が抑制されることが示された。これまで、多量に産生された I 型 IFN は Th1 細胞の分化に抑制的に作用することが報告されている。しかし、一般的に I 型 IFN は多様な免疫反応の制御に関わっており、正常レベルの I 型 IFN 産生が Th1 型細胞の機能維持に関与する可能性も考えられる。以上の結果から、BCG 接種後に誘導される T 細胞の機能制御には PD-1 以外の経路も関与することが明らかになった。この機序の全体像を明らかにすることが、ワクチン効果を増強するために必要である。

E. 結論

BCG 接種により誘導される抗原特異的 T 細胞機能の制御には PD-1 が重要な役割を果たしているが、それ以外に Tim3、CD46 および I 型 IFN 等を介した複数の機序が関与することが示された。この結果は、BCG 接種した際に誘導される感染防御が正常マウスに比べて PD-1 欠損マウスでそれほど顕著でなかったことと一致する。一方、抗ウイルス活性や抗腫瘍活性が PD-1 シグナルを阻害することで明らかに増強することが示されていることから、BCG 接種で誘導される免疫制御機序は、BCG に特徴的であると考えられる。今後、この機序の全体像を明らかにし、ワクチン効果を増強するための有益な情報を提供したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai,

K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama, and I. Kawamura. 2014. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 α from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathog Dis.*, 70: 51-60.

2. 学会発表

1) 河村伊久雄. 抗結核感染防御における ASC の重要性について. 第 84 回実験結核研究会 2014 年 5 月 岐阜市

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