

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460170

研究課題名(和文) 結核菌生菌特異的な宿主細胞傷害活性の解析

研究課題名(英文) Analysis of cytotoxicity to host cells of live bacilli among Mycobacterium species

## 研究代表者

灌井 猛将 (Taki i, Takemasa)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80244573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：以前に、結核菌は宿主細胞に対して生菌特異的に細胞傷害活性を持つことを見出している (JICR, 2001)。本研究では菌の抗酸化活性の強弱が宿主細胞内での生存と宿主からのサイトカイン産生誘導能に関係していることから、これらが相関していることが示唆された (Kekkaku, 2015, Microbiol Immunol., 2015)。毒力の強い抗酸菌で抗酸化活性が高いことから、抗酸化能と宿主細胞傷害活性に何か関係があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that virulent Mycobacteria exhibit strong cytotoxicity to host cells (JICR, 2001). Supported by this research fund, we revealed that the anti-oxidative activity of those bacilli would relate to the long time survival in the host cells and the strong activity of cytokines production from infected host cells (Kekkaku, 2015, Microbiol Immunol., 2015). So, we expected that the anti-oxidative activity of the bacilli would relate to the cytotoxicity to the host cells.

研究分野：微生物免疫学

キーワード：感染症 結核菌 細胞傷害性 サイトカイン 抗酸化活性

## 1. 研究開始当初の背景

結核菌が宿主細胞傷害活性を持つことを報告している(*J. Interferon Cytokine Res.*, 2001). 本活性は菌の宿主細胞内での生存率に相関していることから, 抗菌薬の薬剤感受性試験法や新規抗結核薬のスクリーニング法に応用を考えた (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 2005). さらに, 感染宿主細胞からの IL-1 産生と宿主細胞内での菌の生存に関連があった (*FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2009, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010). 宿主内での長期生存能について, IL-1 で誘導される STAT 6 シグナルとも関連があることを報告している (*Vaccine*, 2011).

## 2. 研究の目的

本研究では, 結核菌の属する抗酸菌属の生菌による宿主細胞傷害活性について, 生化学的, 分子細胞遺伝学的な手法を用いて解析を行う.

## 3. 研究の方法

(1) 菌株: *Mycobacterium bovis* BCG 亜株 (Australia ATCC 35739, Connaught ATCC 35745, Danish ATCC 35733, Glaxo ATCC 35741, Mexico ATCC 35738, Montreal ATCC 35735, Pasteur ATCC 35734, Phipps ATCC 35744, Russia ATCC 35740, Tice ATCC 35743), Australia vaccine seed, Sweden 株は国立感染症研究所の山本三郎博士より供与された. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 25618, Colorado State University より供与された. *M. bovis*, *M. bovis* BCG Brazil, *M. smegmatis* は結核研究所より供与された. 各菌株は Middlebrook 7H9 Broth / 0.25 % Tween 80 / 10% ADC 培地にて培養した.

(2) カタラーゼ活性の測定: catalase を含まない培地(Middlebrook 7H9 10% AD)で菌を培養

する. 菌が十分に増殖した後に集菌し, beadsVita にて菌体を破砕した. 破砕溶液に含まれるタンパク質を定量し, カタラーゼを含む試料とした. 一定量のタンパク質を含む菌を破砕した試料に過酸化水素を加えて, 過酸化水素の分解を吸光度計で測定した. 吸光度変化を市販のカタラーゼと比較して比活性を求めた.

(3) スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性の測定: 上記の操作で得たタンパク質中に含まれる SOD を Dojindo の SOD アッセイキットで測定した.

(4) Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA 法) による培養上清中のサイトカインタンパクの測定: 宿主細胞 (マウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7, マウス初代培養骨髄細胞) を  $1 \times 10^5$  cells/well で 24 Well プレートにまき, 37 °C, 24 時間培養後, MOI=10 相当の菌を含む DMEM(+ Penicillin, 5 % FBS) を細胞に加え, 37 °C で培養した. 72 時間後の培養上清を回収し, ろ過滅菌を行い ELISA 法で測定した. Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Set (BD Biosciences), mouse IL-10 ELISA Set (BD Biosciences), mouse IL-12 ELISA Set (BD Biosciences), mouse TNF- $\alpha$  ELISA Set (BD Biosciences) を使用し, 使用法は添付の方法に従って行った.

## 4. 研究成果

感染宿主細胞の中の抗酸菌は宿主細胞が産生する酸化物質に対して抵抗する様々な仕組みを備えている. その中でもカタラーゼ (KatG) やスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) のような活性酸素種を無毒化する酵素がよく知られている (Takii, Kekkaku, 2015). 宿主細胞傷害活性と宿主細胞内での菌の生存

について関連を調べるために、菌の抗酸化酵素の活性と感染宿主細胞からのサイトカイン産生能を測定した。ウシ型結核菌の弱毒株 BCG の中には亜株が存在していることが知られている(Behr, et al., *Science*, 1999)。また、亜株間で免疫誘導活性に違いがあることを我々の研究で明らかにしている(Hayashi, et al., *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 2009)。この違いが宿主細胞内での生存能の違いにあるのではないかと考え、BCG 亜株間でのカタラーゼ活性と SOD 活性を検討したところ SOD 活性には大きな差がなく、カタラーゼ活性に差が認められた。次に宿主細胞内での生存について、一定期間 BCG を感染させた宿主から菌を回収し、寒天プレートに播種して培養後、生えてきたコロニーを数えることにより宿主内の生菌数を測定した。予想通り、抗酸化活性が高い亜株の方が宿主細胞内での生存数が多かった。続いてサイトカイン誘導能を測定したところ Th1 サイトカインである IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  の産生誘導能と宿主細胞生存能に相関が見られた。一方、免疫抑制系のサイトカインである IL-10 の誘導には逆相関が見られた(Microbiol Imunol., 2015) ことから、宿主細胞内の生存能は単に感染宿主だけではなく、他の細胞との関係(細胞傷害性 T 細胞)などとの関係があることが示唆された。以上のように、本現象は単に感染細胞だけでなく、組織レベル、個体レベルに対する菌の毒性とも関係することが予想された。抗酸菌の生菌特異的な本因子が明らかになり、その機構の詳細を解明することで、未だ明らかになっていない結核の病原性の解明や、結核ワクチンの開発に貢献できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Takii T. Sensors in Mycobacteria for the detection

of redox stress. *Kekkaku*. 2015; 90(7): 579-91.

[http://www.kekkaku.gr.jp/pub/vol90\(2015\)/vol90no7p579.pdf](http://www.kekkaku.gr.jp/pub/vol90(2015)/vol90no7p579.pdf)

2. Taniguchi K, Miyatake Y, Hayashi D, Takami A, Itoh S, Yamamoto S, Hida S, Onozaki K, Takii T. Early-shared *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin sub-strains induce Th1 cytokine production in vivo. *Microbiol Immunol*. 2015;59(11): 684-9.

DOI: 10.1111/1348-0421.12326.

3. Taniguchi K, Takii T., Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, Maruyama M, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Hasegawa T, Miyatake Y, Itoh S, Onozaki K. Reactivation of immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Immun Ageing*. 2013;10(1):25

DOI: 10.1186/1742-4933-10-25.

4. Itoh S, Yokoyama R, Kamoshida G, Fujiwara T, Okada H, Takii T., Tsuji T, Fujii S, Hashizume H, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) inhibits blood coagulation by binding to prothrombin and factor Xa via their  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) domain. *J Biol Chem*.

2013;288(30):21569-80.

DOI: 10.1074/jbc.M113.451419.

5. Fujiwara N, Porcelli SA, Naka T, Yano I, Maeda S, Kuwata H, Akira S, Uematsu S, Takii T., Ogura H, Kobayashi K. Bacterial sphingophospholipids containing non-hydroxy fatty acid activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(6):1177-84.

DOI: 10.1016/j.bbali.2013.03.008.

6. Itoh S, Yamaoka N, Kamoshida G, Takii T., Tsuji T, Hayashi H, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 8 (SSL8) binds to tenascin C

and inhibits tenascin C-fibronectin interaction and cell motility of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433(1):127-32.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.050.

7. Adachi M, Okamoto S, Chujo S, Arakawa T, Yokoyama M, Yamada K, Hayashi A, Akita K, Takeno M, Itoh S, Takii T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Hayakawa K, Miyazawa K, Onozaki K. Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1-beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa-B activation and novel NF-kappa-B sites. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(6):297-307.

DOI:10.1089/jir.2012.0107.

〔学会発表〕(計24件)

1. 小川翔大, 高見篤郎, 富田陽香, 徳田美季, 伊藤佐生智, 林大介, 山本三郎, 肥田重明, 小野寄菊夫, 瀧井猛将

結核ワクチン BCG Tokyo172 サブタイプ間のレドックス関連遺伝子の発現誘導の解析

日本薬学会第136年会 2016年3月29日(横浜)  
29AB-pm328

2. 瀧井猛将, 小川翔大, 山本龍二, 伊藤佐生智, 堀田康弘, 大原直也, 小川賢二, 八木哲也, 前田伸司, 藤原永年, 山崎雄, 西森 敬, 後藤義孝, 肥田重明, 小野寄菊夫

*Mycobacterium avium* の酸性環境下で誘導されるアルギニンデヒミナーゼの解析

第89回日本細菌学会 2016年3月24日(大阪)  
P2-018

3. Takemasa Takii, Tetsuya Yagi, Kenji Ogawa, Shinji Maeda, Kei Nishimori, Nagatoshi Fujiwara, Yoshitaka Goto, Toshio Yamazaki, Naoya Ohara, and Kikuo Onozaki

A Contribution of arginine deiminase pathway to the acid tolerance response

in *Mycobacterium avium* sub-strains *avium* and *hominissuis*

The U.S.–Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50th Anniversary Celebration 18<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) January 11-15, 2014 (Washington DC, USA)

4. 富田陽香, 小川翔大, 花村菜月, 宮田江里香, 伊藤佐生智, 肥田重明, 小野寄菊夫, 瀧井猛将  
トリ型結核菌 *Mycobacterium avium* における酸耐性機構の解析

日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2015 2015年11月1日(名古屋)  
L-7

5. Takemasa Takii

Contribution of arginine deiminase pathway to the acid tolerance response in *Mycobacterium avium* substrains NCU 65<sup>th</sup> Anniversary Event Biodiversity and environmental medicine in South East and East Asia base on molecular biology 2015. July 16-17, 2015 (Nagoya) (特別講演)

〔産業財産権〕  
出願状況(計2件)

名称: ワクチンアジュバント及び免疫増強剤  
発明者: 瀧井猛将, 小野寄菊夫, 山中淳平, 北川慎也, 竹野聖史  
権利者: 名古屋市立大学, 名古屋工業大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-140033  
出願年月日: 平成 26 年 7 月 7 日  
国内外の別: 国内

名称: 抗結核薬のスクリーニング方法  
発明者: 瀧井猛将, 前田伸司, 和田崇之, 伊藤佐生智, 小野寄菊夫, 長谷川倫宏  
権利者: 公益財団法人名古屋産業科学研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-103238  
出願年月日: 平成 24 年 5 月 15 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 抗結核化合物, 及びその利用方法

発明者：瀧井猛将，堀田康弘，千葉拓，森雅美，小野寄菊夫  
権利者：名古屋市立大学  
種類：特許  
番号：第 5391721 号  
出願年月日：平成 25 年 10 月 25 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/esk/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

研究者氏名：瀧井 猛将  
ローマ字表記：TAKII TAKEMASA  
所属研究機関名：名古屋市立大学  
部局：大学院薬学研究科 准教授  
研究者番号：80244573