

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08774

研究課題名(和文) 結核菌の新しいヒト免疫抑制機構の解明とその解除による新規制御法の開発

研究課題名(英文) Assessment of immunosuppressive mechanism induced by Mycobacterium tuberculosis infection and development of new strategy against tuberculosis by preventing it.

研究代表者

尾関 百合子(Ozeki, Yuriko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00169301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：結核は、最大級の細菌感染症であり、結核菌はその起因菌である。結核菌は一旦感染が成立するとヒト体内から排除されることなく、無症候感染といつかたちで潜伏する(潜在性結核)。無症候感染者は人類の1/3に及び、年率約1%で発症するが、HIV感染、糖尿病など免疫抑制を伴う負荷は、発症リスクを上昇させる。このことは、宿主免疫応答が結核の発症と潜在化に多大に関与することを示している。本研究では結核菌の宿主に対する免疫抑制機構の一端を明らかにするとともに、それを解除する方法を見だし、ワクチン開発の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核菌は宿主の免疫防御機構を回避して排除されることなく潜伏し、宿主の弱体化に伴い発症する。この宿主免疫回避と結核発症機構については未だ解明されておらず、宿主免疫活性化によるその解除方法も確立されていない。このような背景のもと、結核は撲滅が困難な疾病のひとつとなっている。本研究では結核菌のヒト免疫抑制機構を解除して免疫活性化を誘導する方法を見だし、新規ワクチン開発への可能性を提案した。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis is the leading cause of death by infectious disease worldwide. Mycobacterium tuberculosis, causative agent of tuberculosis, is not eradicated from human body once infection is established. One third of world population are latently infected with Mycobacterium tuberculosis, one percent of infected population develop tuberculosis a year, however immunosuppressive disease such as HIV infection and diabetes increase the risk of development. This fact indicates that host immune system controls the development of tuberculosis. This research aims to establish new methods to control development of tuberculosis in addition to elucidate the mechanism of host immune suppression by M. tuberculosis infection. Eventually we proposed the new vaccine candidate to cancel immune suppression to host by M. tuberculosis infection.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 結核菌抗原 制御性T細胞 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

結核菌はヒト免疫機構を巧みに回避して潜伏感染する。潜伏感染者は世界人口の 1/3 を占める。結核発症の大部分はこれら潜伏感染者からの結核菌の再燃によるものであるため、潜伏感染菌を排除することが結核発症予防に繋がると申請者は考えた。数種の病原体について、宿主体内から、これらの排除を妨げるものとして制御性 T 細胞が知られている。制御性 T 細胞は、主要な免疫抑制細胞で、一般に自己（宿主）抗原を認識して分化する。しかし申請者は、一部の結核菌抗原が、ヒト制御性 T 細胞を分化させることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究は結核菌による免疫抑制機構を誘導する、あるいは解除する結核菌抗原を見だし、それを利用した新規結核制御法を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血単核球(PBMC)あるいはヒト全血と結核菌抗原を培養し、制御性 T 細胞の誘導をフローサイトメトリー法、結核菌感染防御に必要なサイトカインの産生を ELISA 法を用いて探索した。

(2) 上記で見いだした抗原を大腸菌および迅速発育弱毒菌に過剰発現させ、精製して解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 免疫抑制作用と感染防御作用の二面性を有する抗原の発見

BCG 接種歴を有する成人健常者の PBMC あるいは全血から制御性 T 細胞を誘導する免疫抑制的な抗原群のなかに、結核菌感染防御に有用なサイトカインを多量に産生する抗原(抗原 X)が存在することを見いだした。

(2) 抗原 X の過剰発現系の構築と精製

抗原 X を大量に得るために、種々の大腸菌を宿主とした過剰発現系を構築した。また、抗原 X は大腸菌では発現しにくいレアコドン为数個有するため、発現量が少ない。発現量の増加を目指し、抗原 X の DNA 配列を大腸菌に最適化したコドンに置き換え、BL21(DE3)pLys 株に形質転換した。また、mRNA の安定性を向上させた BL21(DE3) Star 株およびレアコドン供給可能な BL21(DE3) Rosetta 株に形質転換した。その結果、Rosetta 株での抗原 X 発現量が最も高かった。さらに抗酸菌を宿主とした過剰発現系の構築および精製方法を検討した。アセトアミダーゼ遺伝子の下流に本遺伝子を His タグを付加して抗酸菌 大腸菌シャトルベクターに挿入し、弱毒迅速発育菌 *M. smegmatis* mc² 155 株に形質転換した。アセトアミド添加 1 日 ~ 2 日後に抗原 X の発現量が最大となった。菌体を破碎し、緩衝液に懸

濁してニッケルカラムを用い、HPLC (AKTA explorer/10s)で精製を行った。培養液 1 L から 2 mg 程度の抗原 X が得られた。 *M. smegmatis* を宿主として得た抗原 X (mAgX)は大腸菌を宿主として得た抗原 X (eAgX)よりも分子量が大きい傾向があり、高濃度では eAgX よりも多量体を形成しやすい傾向が見られた。

(3) 大腸菌発現系抗原と抗酸菌発現系抗原の免疫応答の差異

宿主免疫応答をみるため、eAgX、mAgX を BCG 接種歴を有する成人末梢血単核球 (PBMC) あるいは全血とともに培養し、産生されたサイトカイン量を測定した。抗酸菌を宿主とした mAgX は大腸菌を宿主とした eAgX よりもヒト PBMC あるいはヒト全血からの IFN-gamma 誘導能、CCL 誘導能ともに高かった。IL-10 産生量はわずかであったが、mAgX で高い傾向が見られた。

(4) アジュバントの効果

eAgX、mAgX をアジュバントとして Toll like receptor のリガンドとともに培養した。AgX 単独よりも IFN-gamma 産生量、CCL 産生量ともに増加し、とくに mAgX とアジュバントの組み合わせで顕著に高い IFN-gamma 産生がみられた。さらに mAgX は単独では制御性 T 細胞誘導能を有するが、アジュバントとの組み合わせでその誘導は解除された。mAgX と他の数種類の結核菌抗原のサイトカイン誘導能を比較すると IFN-gamma、CCL2、IL-10 産生量ともに mAgX で高い傾向があった。

以上の結果より、mAgX とアジュバントとしての TLR like receptor リガンドを組み合わせる成人へ投与方法は結核菌による宿主免疫抑制を解除し、さらに防御免疫を増強することが示された。本方法は結核発症に対する新規制御法として期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1) Mayuko Osada-Oka, Nobuhito Goda, Hiroyuki Saiga, Masahiro Yamamoto, Kiyoshi Takeda, Yuriko Ozeki, Takehiro Yamaguchi, Tomoyoshi Soga, Yu Tateishi, Katsuyuki Miura, Daisuke Okuzaki, Kazuo Kobayashi, Sohkiichi Matsumoto. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for *Mycobacterium tuberculosis* infection. Int Immunol. 2019. doi: 10.1093/intimm/dxz048 (in press).
- 2) Maekura R, Kitada S, Osada-Oka M, Tateishi Y, Ozeki Y, Fujicawa T, Miki M, Ogawa J, Mori M, Matsumoto S. Serum antibody profiles in individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbiol Immunol. 2019. 63, 130-138.
- 3) Ohara Y, Ozeki Y, Tateishi Y, Mashima T, Arisaka F, Tsunaka Y, Fujiwara Y, Nishiyama A, Yoshida Y, Kitadokoro K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawa I, Maekura R, Yamamoto S,

- Katahira M, Matsumoto S. Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis. PLoS One. 2018.13(10):e0204160.
- 4) Savitskaya A, Nishiyama A, Yamaguchi T, Tateishi Y, Ozeki Y, Nameta M, Kon T, Kaboso SA, Ohara N, Peryanova OV, Matsumoto S. C-terminal intrinsically disordered region-dependent organization of the mycobacterial genome by a histone-like protein. Sci Rep. 2018. 8(1):8197.
 - 5) Inoue M, Niki M, Ozeki Y, Nagi S, Chadeka EA, Yamaguchi T, Osada-Oka M, Ono K, Oda T, Mwendu F, Kaneko Y, Matsumoto M, Kaneko S, Ichinose Y, Njenga SM, Hamano S, Matsumoto S. High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor alpha production by mycobacteria-infected human macrophages. Sci Rep. 2018. 8(1):6736.
 - 6) Hayakawa T, Watanabe M, Tomiyama C, Sasagawa A, Honma T, Inada T, Abo T. Effects of Mild Hyperthermia Treatment Using Nano-Mist Sauna on Blood Gas Parameters and Skin Appearance. Health, 2018; 10: 577-586. DOI: 10.4236/health.2018.105046
 - 7) 尾関百合子、松本壮吉。結核免疫防御機能。呼吸器ジャーナル 2018.66 巻 p643-649。
 - 8) Chadeka EA, Nagi S, Sunahara T, Cheruiyot NB, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M, Osada-Oka M, Okabe M, Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwendu F, Kikuchi M, Nakamura R, Kalenda YDJ, Kaneko S, Hirayama K, Shimada M, Ichinose Y, Njenga SM, Matsumoto S, Hamano S. Spatial distribution and risk factors of Schistosoma haematobium and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2017.11(9):e0005872.
 - 9) Enany S, Yoshida Y, Tateishi Y, Ozeki Y, Nishiyama A, Savitskaya A, Yamaguchi T, Ohara Y, Yamamoto T, Ato M, Matsumoto S. Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of *Mycobacterium smegmatis* and simultaneously coordinates cellular functions. Sci Rep. 2017. 7(1):6810.
 - 10) Shichiri K, Tachibana A, Abe H, Kunizuka T, Yoshida Y, Tomiyama C, Watanabe M. Characteristic Changes Defined via Comparison of the Big-Five Personalities in Japanese University Freshmen from Years 2000 to 2016. Health 2017; 9, 1348-1354.
 - 11) Iwasa Y, Muramatsu Y, Aoki H, Tomiyama C, Saito T, Nishikata M, Uchiyama M. Sleep and Stress of Late Middle Age Males Who Are Forced to Live in Emergency Temporary Houses and Post-Earthquake Public Houses for a Long Period Due to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station Accident. Health 2017; 9, 1787-1800.
 - 12) Watanabe M, Nakamura Y, Tomiyama C, Abo T. A Specific pattern in the basal body temperature chart during the first week of pregnancy may warn of a miscarriage crisis. Health 2016; 8: 723-729.

〔学会発表〕（計 19 件）

- 1) Yukiko Ohara, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto et al. Purification of *M. tuberculosis* protein, and its application for diagnosis. 第 92 回日本細菌学会総会。2019 年 4 月 23～25 日。
- 2) Yoshitaka Tteishi, Yusuke Minato, Akihito Nishiyama, Yuriko Ozeki et al. Transposon

sequencing assay of essential gene for biofilm formation in nontuberculous mycobacteria. 第 92 回日本細菌学会総会。2019 年 4 月 23~25 日。

- 3) 尾関百合子、松本壮吉。組換え抗酸菌による結核菌抗原のブースターワクチン効果の検証およびメカニズムの解明。平成 30 年度中部乳酸菌研究会総会。2018 年 11 月 29~30 日。
- 4) 結核菌に対する新規抗菌薬 Lysocin E の抗菌作用，口頭，稲泉 茜，山口 雄大，尾関百合子，西山 晃史，浜本 洋，関水 和久，松本 壮吉，第 55 回日本細菌学会中部支部総会，2018 年 10 月 12-13 日，石川県金沢市 金沢医科大学
- 5) 潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用，大原 由貴子，尾関 百合子，立石 義隆，真嶋 司，有坂 文雄，津中 康央，藤江 芳江，西山 晃史，吉田 豊，北所 健悟，小林 悠，金子 幸弘，中川 一路，前倉 亮治，山本 三郎，片平 正人，松本 壮吉，第 55 回日本細菌学会中部支部総会，2018/10/12-13，石川県金沢市 金沢医科大学
- 6) Hirama H, Tomiyama C, Watanabe H, Yamamoto H. Possible factors which exacerbate autoimmune hepatitis in low-level estrogen. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. (Fukuoka) 2018.12. 10-12.
- 7) 岩佐有華、村松芳幸、青木萩子、富山智香子、内山美枝子、齋藤智子、西方真弓。原発事故により長期に避難生活を送る壮年期男性の客観的睡眠と唾液ストレスバイオマーカーの関連。日本睡眠学会第 43 回定期学術集会。(札幌) 2018. 7.11-13.
- 8) Tomiyama C, Watanabe M, Hayakawa T, Honma T. The effects of a long-term repetitive mild hyperthermia treatment on the host defense mechanism and the autonomic nervous system. The 83rd Annual Meeting of the Japanese Society of Balneology, Climatoligy and Physical Medicine. (Kagoshima) 2018. 5. 19-20.
- 9) Yoshitaka Tateishi, Takahiro Totani, Yukiko Nishiuchi, Yutaka Yoshida, Akihito Nishiyama, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto. Biofilm formation in Mycobacterium avium subsp. hominissuis — Role of hypoxia, eutrophy and glycopeptidolipid. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16, Niigata, Japan
- 10) Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi, Ni Made Mertaniasih, Soedarsono4, Yuriko Ozeki, and Sohkichi Matsumoto. Antibody responses from tuberculosis patients in Surabaya, Indonesia against *Mycobacterium tuberculosis* protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
- 11) Mayuko Osada-Oka, Mutsumi Sato, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto. The role of HIF-1 α -regulated genes in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16, Niigata, Japan
- 12) Ozeki Y., Igarashi M., Doe M., Tamaru A., Matsumoto S. et al. A New Screen for Tuberculosis Drug Candidates Utilizing a Luciferase-Expressing Recombinant Mycobacterium bovis

Bacillus Calmette-Guérin. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd
Mycobacterial Pannel Meeting, 2018/3/15-16, Niigata, Japan

- 13) Hirama H, Tomiyama C, Watanabe H. The effects of ovariectomy on autoimmune hepatitis and hepatic dendritic cells. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. (Sendai) 2017.12. 12-14.
- 14) 尾関百合子、松本壮吉。組換え抗酸菌による結核菌抗原のブースターワクチン抗原・診断抗原としての有効性の検討。平成 29 年度中部乳酸菌研究会総会。2017 年 11 月 24~25 日。
- 15) Hayakawa T, Watanabe M, Tomiyama C. The Effects of a Hyperthermia Treatment on our Health and Beauty. The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society of Balneology, Climatoligy and Physical Medicine. (Yoichi) 2017.6. 24-25.
- 16) Yuriko Ozeki, Manabu Inoue, Sohkiichi Matsumoto et al. High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor alpha production by mycobacteria-infected human macrophages. 第 91 回日本細菌学会総会。2017 年 3 月 27~29 日。
- 17) 西山 晃史、Shymaa Enany、立石 善隆、尾関 百合子、Anna G. Savitskaya¹、山口雄大、西田由貴子、阿戸学、松本 壮吉。抗酸菌の長期の生存に必須な細胞機能のヒストン様タンパク質依存的な制御。第 90 回日本細菌学会総会。仙台、2017 年 3 月 19 日~21 日。
- 18) Tomiyama C, Watanabe H. The blockade of estrogen receptors on dendritic cells exacerbates autoimmune hepatitis. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. (Okinawa) 2016.12. 5-7.
- 19) 尾関百合子、松本壮吉。組換え抗酸菌による結核菌抗原の発現・精製とそのワクチン効果の検討。平成 28 年度中部乳酸菌研究会総会。2016 年 11 月 18~19 日。

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：富山 智香子

ローマ字氏名：Tomiyama Chikako

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号：80359702

(2) 研究協力者

なし