

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590122
 研究課題名（和文） 結核菌生菌の宿主細胞傷害活性におけるインターロイキン 1 関連シグナル調節機構の解析
 研究課題名（英文） Relation of the cytotoxic effect of *Mycobacterium tuberculosis* on host cells and the signal transduction from interleukin 1 (IL-1) receptor and IL-1R related receptors
 研究代表者
 瀧井 猛将 (TAKII TAKEMASA)
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：80244573

研究成果の概要（和文）：抗酸菌の細胞壁成分は脂質に富んでおり、自然免疫系に關与しているレセプター、toll like receptors (TLRs)のリガンドとであることがよく知られている。そのシグナル伝達様式は IL-1 レセプターからのものと共有していることが知られている。病原性の異なる抗酸菌（結核菌と BCG）間で、TLR からの NF- κ B の活性化を調べたところ、結核菌に強い誘導活性が認められ病原性と関係していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Mycobacterium* species possess lipid rich cell wall, which is well known to induce innate immune response in host cells through toll like receptors(TLRs). The signal transduction form the receptor is partly shared with it form interleukin 1 receptor (IL-1R). We compared the inducing activity of NF- κ B between *M. tuberculosis* and its vaccine strain BCG. The activity related to their virulence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

申請者は *Mycobacterium tuberculosis* がヒト培養細胞株に対して生菌特異的に細胞

傷害活性を持つことを明らかにしている(J. Interferon Cytokine Res. 2000)。更に、本現象を基本に抗結核薬のスクリーニング法、及

び薬剤感受性試験に応用出来ることを報告している (Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 2005)。本現象はインターロイキン 1 (IL-1) で活性化されることがわかっている。特に線維芽細胞では、IL-1 で細胞が増殖するのに対し、結核菌生菌存在下では IL-1 は細胞増殖を抑制することを明らかとしている。細胞傷害活性の強度はヒト型 > ウシ型 > トリ型結核菌の順であった。細胞傷害活性の一部は感染後の宿主細胞から産生される因子によることを明らかとしている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞傷害活性を誘導する細菌側の因子としてミコール酸の組成についての株間での比較、及び宿主側因子の応答として一酸化窒素(NO)とサイトカイン産生との関連を検討することで細胞傷害活性を誘導する因子について *Mycobacterium bovis* BCG の亜株を用いて検討を行った。

3. 研究の方法

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 H37Rv 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。

一酸化窒素 (NO) の測定：ヒト肺胞上皮細胞株 A549、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞、マウス初代培養骨髄細胞に

BCG を Multiplicity of infection(MOI)=10 で感染させた。もしくは TDM でコートした培養プレートに細胞をまくか、TDM でコートしたガラスビーズを細胞あたり 10 個加えた。48 時間後に培養上清を回収し、ろ過滅菌後 diaminonaphtalen(DAN)を用いた蛍光法で測定した。

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 (ヒト肺胞上皮細胞株 A549、ヒト単球系培養細胞株 THP-1、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 1×10^5 cells/well で 24 Well プレートにまき、37、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 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。Human IL-6 ELISA Set (BD Biosciences)、Human IL-8 ELISA Set (BD Biosciences)、Human TNF- α ELISA Set (BD Biosciences)、Human IL-1 β ELISA Set (BD Biosciences)、Human IL-12 ELISA Set (BD Biosciences)、mouse IL-12 ELISA Set (BD Biosciences)、mouse TNF- α 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

自然免疫系の活性化の指標として、宿主細胞からの一酸化炭素(NO)の産生と炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) の産生を測定した。Pasteur 研究所からの分与時期が早い初期分与株(Russia, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug)の方が後期分与株 (Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia, Pasteur) と比べて高い傾向が見られた。この結果は、mma3 変異とよく相関していた。初期分与株の代表として Japan 株、後期分与株の代表として Connaught 株が

ら抽出したTDMを用いてNOとIL-12, TNF- α の産生誘導活性を検討した結果、誘導活性は全体的に弱いながら、菌体そのもので刺激した場合と同様の結果が得られた。IL-1 β の産生については、生菌と死菌で逆の結果が得られた。以上のように初期分与株の生菌が自然免疫系の優れた誘導活性があることが明らかとなった。今後、自然免疫を強く誘導するBCGがメモリー誘導活性や結核防御活性を持つか、否か、検討していく必要がある。本研究の結果、初期分与株(Russia, Moreau, Japan, Sweden, Birkhaug)の方が後期分与株(Danish, Glaxo, Mexico, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia, Pasteur)と比べて自然免疫系をよく活性化することが明らかとなった。この結果は、mma3変異とよく相関していた。菌側からの宿主細胞への活性化の機構の一部にメトキシミコール酸の関与が示唆された。結核菌の病原性に糖脂質の末端のアラビノースが関係しているとの報告もある。また、これらの菌側の因子の宿主細胞側のレセプターとして toll like receptor(TLR)があり、その細胞内シグナル伝達部分はIL-1のレセプターと共通の分子を使用しているとの報告もある。本研究では菌側因子としてミコール酸のサブセット(、メトキシ、ケト)の違いにより宿主細胞の応答が異なることを明らかとした。また、菌体で刺激した場合と抽出したミコール酸画分ではサイトカイン誘導が異なることから他の菌体成分も関与していることが示唆された。死菌では細胞死誘導活性が見られないことから、ミコール酸画分と菌体で刺激した時の誘導が異なったサイトカインについて、その誘導機構と細胞傷害活性が連関していることが示された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計9件)

1. IL-1-induced ERK1/2 activation up-regulates p21(Waf1/Cip1) protein by inhibition of degradation via ubiquitin-independent pathway in human melanoma cells A375.

Arakawa T, Hayashi H, Itoh S, Takii T, Onozaki K. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 392(3): 369-72.

2. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway.

Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Yokoyama R, Takii T, Onozaki K, Tsuji T. Mol Immunol. 2010;47(4):932-8.

3. Synthesis of new sugar derivatives and evaluation of their antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*.

Horita Y, Takii T, Chiba T, Kuroishi R, Maeda Y, Kurono Y, Inagaki E, Nishimura K, Yamamoto Y, Abe C, Mori M, Onozaki K. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(22):6313-6.

4. Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains.

Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Kondo M, Yasuda E, Inagaki E, Kanai K, Fujiwara A, Kawarazaki A, Chiba T, Onozaki K. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009 ; 56(2): 116-28.

5. Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry.

Uenishi Y, Takii T, Yano I, Sunagawa M. J Microbiol Methods. 2009;77(3):320-2.

6. Cigarette smoke condensate upregulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synovial cell line.

Shizu M, Itoh Y, Sunahara R, Chujo S, Hayashi H, Ide Y, Takii T, Koshiko M, Chung SW, Hayakawa K, Miyazawa K, Hirose K, Onozaki K.

J Interferon Cytokine Res. 2008;28(8):509-21.

7. The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 alpha in human melanoma cells.

Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T, Onozaki K.

J Leukoc Biol. 2008 ;83(1):190-9.

8. Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor alpha induced interleukin-1alpha mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells.

Itoh Y, Hayashi H, Xu J, Takii T, Miyazawa K, Ariga H, Akahoshi T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Okamoto T, Onozaki K.

Biol Pharm Bull. 2007 ;30(6):1140-3.

9. Synthesis of new sugar derivatives from *Stachys sieboldi* Miq and antibacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Staphylococcus aureus*.

Chiba T, Takii T, Nishimura K, Yamamoto Y, Morikawa H, Abe C, Onozaki K.

Bioorg Med Chem Lett. 2007;17(9):2487-91.

[学会発表](計68件)

1. 伊藤 佐生智, 濱田 恵里, 鴨志田 剛, 横山 領介, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫, 辻 勉

黄色ブドウ球菌のスーパー抗原様タンパク質 SSL10 はヒトIgG に結合し古典経路による補体活性化を抑制する

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日(岡山)
30P-am511

2. 谷口 恵一, 瀧井 猛将, 安田 恵実, 林 大介, 向井 徹, 山本 三郎, 小野寄 菊夫

Mycobacterium bovis BCG の宿主細胞内生存能と抗原性の発現に関する研究

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日(岡山)
30P-pm022

3. 許 鍵, 伊藤 友香, 瀧井 猛将, 林 秀敏, 小野寄 菊夫

男性ホルモンによる関節リウマチ滑膜細胞からの炎症性サイトカインの産生抑制

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日(岡山)
0P-pm035

4. 岡本 翔佑, 中條 里美, 瀧井 猛将, 林 秀敏, 早川 和一, 小野寄 菊夫

タバコと関節リウマチに関する研究

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日(岡山)
30P-pm365

5. 荒川 友博, 林 秀敏, 伊藤 佐生智, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫

インターロイキン-1 によるヒトメラノーマ細胞増殖抑制機構の解析

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日(岡山)
28SE-pm17

6. 堀田 康弘, 瀧井 猛将, 小川 賢二, 稲垣 衣美, 小野寄 菊夫

抗酒薬ジスルフィラムの抗結核作用についての検討

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日(岡山)
28SG-am14Q

7. 黒石 隆司ほか

OCT313 の誘導体の作製と抗結核作用の解析

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日(岡山)
28SG-am15

8. 山本 龍二, 瀧井 猛将, 堀田 康弘, 小川 賢二, 小野寄 菊夫

トリ型結核菌亜種のアンモニア産生における Arginine deiminase の関与

日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日(岡山)
28SG-pm07

9. 岡本 翔佑, 林 秀敏, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫
喫煙と関節リウマチ: たばこの煙抽出物は滑膜細胞が

ら炎症性サイトカインの産生を誘導し、コラーゲン誘導性関節炎の発症を増強する

第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月4日(大阪);3-H-W58-11-P

10. 伊藤佐生智、横山領介、辻勉、瀧井猛将、小野崎菊夫

黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL5 は MMP-9 の活性を抑制し、好中球の浸潤を阻害する

第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月4日(大阪);3-J-W62-4-O/P

〔図書〕(計1件)

1. 化学療法学 - 病原微生物・がんと戦う - 監修 上野芳夫 / 大村智、編集 田中晴雄 / 土屋友房 南江堂
抗結核薬の部分分担
p167-179, 2009年

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 抗結核薬及びその用途
発明者: 瀧井猛将、堀田康弘、稲垣衣美、小野崎菊夫
権利者: 名古屋市立大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-21026
出願年月日: 平成21年1月31日
国内外の別: 国内

名称: 抗結核化合物及びその利用
発明者: 瀧井猛将、堀田康弘、小野崎菊夫、千葉拓、森雅美
権利者: 名古屋市立大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-059903
出願年月日: 平成20年3月10日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔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

瀧井 猛将 (TAKII TAKEMASA)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 80244573

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: