

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590443
 研究課題名 (和文) 結核菌病原因子によるマクロファージ機能攪乱の分子機構の解明
 研究課題名 (英文) Perturbation of macrophage function by virulence-associated determinants derived from *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

河村 伊久雄 (KAWAMURA IKUO)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：20214695

研究成果の概要：結核菌ゲノム上に存在する RD1 領域は、マクロファージのミトコンドリア内膜の傷害や、細胞質内カリウムの流出に関与する。その結果、結核菌感染マクロファージでは細胞死やカスパーゼ 1 の活性化が誘導される。一方、PPE37 は炎症性サイトカイン産生を抑制することで結核菌の病原性に寄与する。また、BCG を用いた感染実験で、宿主体内から菌が容易に排除されないのは、PD-1 を介した抑制性シグナル経路が活性化されるためであることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
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：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：結核菌、BCG、RD1、マクロファージ、ネクローシス、カスパーゼ、PD-1、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)は、古くからヒトと共存してきた歴史があり、ヒトを宿主とすることに最も成功した微生物のひとつである。結核菌が宿主に感染すると 3-4 週間後には強い獲得免疫が誘導される。しかし、菌はこの防御反応に抵抗して生存することができる。このことから、結核菌は積極的に宿主防御免疫を制御するメカニズムを働かせて

いることが考えられる。このメカニズムを明らかにすることは、結核に対する新たな感染防御戦略を構築する上で重要な意味を有することは間違いない。そこで本研究では、宿主感染防御に対する結核菌の抵抗性メカニズムを明らかにすることを目的として、結核菌病原因子がマクロファージの機能をいかに攪乱し、菌の増殖に適した環境を維持しているのか。さらに、それらが防御免疫の誘導にどの

ような影響を及ぼしているのかという点について解析する。

2. 研究の目的

マクロファージは結核菌に対する感染防御において殺菌や肉芽腫形成による菌の封じ込めだけでなく、抗原提示細胞として獲得免疫の成立にも関与する重要な細胞である。結核菌はこのマクロファージに侵入して細胞内で生存増殖する細胞内寄生菌であり、細胞内寄生を成立させるためにマクロファージの様々な機能を抑制する活性があることがわかっている。また、その抑制作用は結果的に宿主感染防御全体に大きな影響を与えるものと考えられる。従って、この分子メカニズムを明らかにすることにより、結核菌の感染機序を把握するための重要な情報を得ることができると期待される。そこで本研究では、以下の点に焦点を絞り解析を行う。

(1)これまでの報告から、結核菌の増殖の場となるマクロファージの細胞死を制御することが、感染を成立させるために重要であることが示されている。病原性の強い結核菌は感染マクロファージにネクローシスを誘導する能力が高い。しかし、今のところ感染細胞のネクローシスが病原性発現に必要な理由については推測の域を出ていない。最近、結核菌 RD1 遺伝子領域欠損株の病原性が野生株に比べて低く、感染細胞にネクローシスを誘導する能力も弱いことが報告された。そこで、RD1 領域がどのような機序で感染マクロファージのネクローシス誘導に関与するのかを解析する。また、菌の病原性と防御免疫誘導との関係を明らかにする目的で、RD1 遺伝子領域がマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響についても調べる。

(2)結核菌 PE/PPE ファミリー分子のうち PPE37 の発現が肉芽腫内で著しく高まることが示されており、この因子が結核菌の宿主体内での生存、あるいは病態形成に関与する可能性が考えられる。そこで、この PPE37 の機能を調べる目的で、*M. smegmatis* に PPE37 を発現させ、感染後のマクロファージ機能に及ぼす影響を解析する。

(3)マウスに BCG を感染させ、経時的に臓器内菌数を調べると、特異的防御免疫が発現しているにもかかわらず、感染した菌は排除されず、持続的に各臓器より検出される。この菌の宿主感染防御に対する抵抗性メカニズムを理解するため、BCG 感染後の防御免疫応答の強さ、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の応答性、およびマクロファージ細胞表面抗原の変化について解析する。

3. 研究の方法

(1)RD1 遺伝子領域のマクロファージ機能への影響

結核菌 H37Rv および RD1 遺伝子領域欠損株(H37Rv Δ RD1)をマウス腹腔滲出マクロファージあるいはマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に感染させ、経時的に乳酸脱水素酵素の培養上清中への遊離量や propidium iodide (PI)による染色性で感染細胞のネクローシスの程度を調べた。また、各種 caspase 活性化、TNF-α および細胞内活性酸素の産生量、ミトコンドリアの膜電位、あるいは細胞内 ATP 量を測定し、RD1 領域が necrosis 誘導にどのように関与するのかを解析した。

RD1 領域が結核菌感染マクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響を明らかにするため、H37Rv と H37Rv Δ RD1 をマウス腹腔滲出マクロファージに感染させ、その後のサイトカイン応答を比較した。

(2)PPE37 のマクロファージ機能への影響

PPE37 の機能を調べるためには、通常結核菌の PPE37 欠損株を作製してその機能を解析するが、結核菌ゲノム上には PE/PPE ファミリーに属する分子が多数存在するため、PPE37 遺伝子を欠損させてもその影響がマスクされてしまう可能性がある。そこで、PPE37 を発現する *M. smegmatis* を作製した。マウス腹腔滲出マクロファージにこの変異株および親株を感染させ、その後のマクロファージ機能を解析した。

(3)BCG 持続感染に関わる抑制性シグナル伝達経路の解析

マウスに BCG を感染させ、経時的に臓器内菌数、CD4⁺ T 細胞の防御免疫誘導能、サイトカイン産生、およびマクロファージ表面抗原の発現量を調べ、BCG の長期生存を可能にしている機序について解析した。

4. 研究成果

(1)RD1 遺伝子領域に依存したネクローシス誘導

RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させたところ、ネクローシスが誘導された。しかし、RD1 欠損株の感染ではネクローシスの誘導は認められず、結核菌によるネクローシス誘導には RD1 領域が重要であることが示された。さらに、H37Rv 感染細胞では、RD1 に依存したミトコンドリア内膜傷害および細胞内 ATP 量の減少が観察された。この結果から、結核菌が感染したマクロファージでは RD1 領域の遺伝子産物によりミトコンドリア内膜が傷害され、ATP 合成が阻害されるため細胞がネクローシスに陥ることが示された。また、

感染量を下げたマクロファージに H37Rv を感染させた場合には、感染初期にカスパーゼ 9 依存的にネクローシスが抑制されることが示された。以上の結果より、病原性の強い結核菌には RD1 領域に依存したネクローシス誘導能があるが、自然感染に近い実験モデルとして少量の菌で感染させた場合にはカスパーゼ 9 の活性化が誘導され、菌が増殖するための場を確保するためネクローシスが抑制されるものと考えられた。

RD1 に依存したカスパーゼ 1 の活性化と IL-18/IL-1 β 産生誘導

サイトカイン産生誘導における RD1 の関与について解析した。H37Rv および H37Rv Δ RD1 でマウス腹腔滲出マクロファージを刺激した場合、IL-6 や TNF- α 産生に違いは認められなかったが、H37Rv Δ RD1 刺激後の IL-18 や IL-1 β 産生レベルは、H37Rv 刺激の場合に比べて著しく低いことが示された。H37Rv と H37Rv Δ RD1 の感染では、IL-18 および IL-1 β mRNA の発現は同程度に認められたが、カスパーゼ 1 の活性化は H37Rv 感染においてのみ観察された。また、これらサイトカイン産生とカスパーゼ 1 活性化はタイプ 1 インターフェロンレセプター非依存的に誘導されることが示された。さらに、カスパーゼ 1 の活性化が細胞外塩化カリウム濃度の増加に応じて阻害され、カリウムイオンの流出を誘導する nigericin 存在下で H37Rv Δ RD1 を感染させると、カスパーゼ 1 の活性化が誘導されることが明らかとなった。以上の実験成績から、RD1 領域はカリウムイオンの流出に関与し、その結果としてカスパーゼ 1 が活性化され、IL-18 や IL-1 β の産生が誘導されるものと考えられた。

(2) PPE37 による炎症性サイトカイン産生の抑制

結核菌の病原性に関与することが考えられる PPE37 の機能を調べるため、PPE37 を発現する *M. smegmatis* を作製し、その影響を調べた。その結果、PPE37 は感染マクロファージの細胞死には影響しないことが示された。しかし、PPE37 は *M. smegmatis* 感染で誘導される IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を抑制した。また、この活性は、MAPK の活性化を抑制することで発揮されることが示唆された。以上の結果より、結核菌はマクロファージに感染後 PPE37 の発現誘導を介して炎症応答を抑制する機序を有することを新たに示すことができた。

(3) BCG 持続感染の成立に関与する PD-1 シグナル経路

BCG 感染後、経時的に臓器内菌数を測定したところ、肺および脾臓における菌数は感染

1 週目をピークとして徐々に減少したが、感染 12 週目においても多数の菌の存在が確認された。一方、BCG 感染 1-12 週目に脾 CD4⁺T 細胞を回収し、正常マウスに養子移入して、この T 細胞の感染防御誘導能を測定した。その結果、BCG 感染 3 週目の CD4⁺T 細胞を移入した場合には強い防御免疫の発現が認められたが、感染後 6 週および 12 週目の T 細胞を移入してもそれほど強い防御免疫を賦与することができなかった。また、*in vitro* で T 細胞機能を測定したところ、BCG 感染 3 週目に脾臓より回収した CD4⁺T 細胞は抗原刺激に対して強い IFN- γ および TNF- α 産生応答を示し、これらサイトカイン産生能を有する感染抵抗性 T 細胞が誘導されていることが示された。しかし、この CD4⁺T 細胞数は臓器内にまだ菌が存在しているにも拘らず感染の経過とともに減少した。BCG 感染 6 週以降の脾臓では制御性 T 細胞数の増加や抑制性サイトカインである IL-10 産生は認められなかったが、抗原提示細胞上の抑制性補助分子 PD-L1 の発現の持続的な亢進が認められた。PD-L1 はそのレセプターである PD-1 を介して抑制性シグナルを T 細胞に伝えることが示されている。そこで、この PD-1/PD-L1 経路が BCG に対する感染防御の抑制に関与するか否かを PD-1 欠損マウスを用いて解析した。PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、経時的に臓器内菌数を測定すると、感染早期の菌数は wild type (WT) マウスとほぼ同じであったが、感染 6 週目以降では、PD-1 欠損マウスの方が菌の排除が亢進していることが示された。また、感染防御の発現に重要な IFN- γ および TNF- α 産生性 CD4⁺T 細胞数は、PD-1 欠損マウスでも WT と同程度に BCG 感染 3 週後に誘導されたが、PD-1 欠損マウスでは感染 6 週目以降でも持続的に存在することが示された。

これらの結果から、PD-L1 の発現が亢進する BCG 感染後期に PD-1/PD-L1 経路を介したシグナルが感染防御に関与する CD4⁺T 細胞の機能を抑制することが示された。この反応は過剰な Th1 応答を抑制する正常な宿主応答であると思われるが、この抑制性メカニズムの存在が BCG の長期生存に有利に働いているものと考えられた。

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 8 件)

1. Hara, H., Tsuchiya, K., Nomura, T., Kawamura, I., Shoma, S., and Masao Mitsuyama, M. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin,

- listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *J. Immunol.* (査読有り) 180: 7859-7868, 2008.
2. Shoma, S., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Nomura, T., Hara, H., Uchiyama, R., Daim, S., and Mitsuyama, M. Critical involvement of pneumolysin in production of IL-1 α and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect. Immun.* (査読有り) 76 (4): 1547-1557, 2008.
 3. 河村伊久雄 結核菌の病原性機序—細胞内寄生戦略 *Kekkaku* (査読なし) 83:690-693, 2008.
 4. 河村伊久雄 結核菌のマクロファージ内生存機構 *Jpn. J. Leprosy* (査読なし) 77: 219-224, 2008.
 5. Kaku, T., Kawamura, I., Uchiyama, R., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.* (査読有り) 274 (2): 189-195, 2007.
 6. Nomura, T., Kawamura, I., Kohda, C., Baba, H., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., and Mitsuyama, M. Irreversible loss of membrane-binding activity of *Listeria*-derived cytolysins in non-acidic conditions: a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram-positive bacteria. *Microbiology* (査読有り) 153: 2250-2258, 2007.
 7. Hara, H., Ikuo Kawamura, Nomura, T., Tominaga, T., Tsuchiya, K., and Mitsuyama, M. Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. *Infect. Immun.* (査読有り) 75 (8): 3791-3801, 2007.
 8. Uchiyama, R., Kawamura, I., Fujimura, T., Kawanishi, M., Tsuchiya, K., Tominaga, T., Kaku, T., Fukasawa, Y., Sakai, S., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* (査読有り) 75 (6): 2894-2902, 2007.

[学会発表] (計 17 件)

1. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 The PD-1:PD-L1 pathway is involved in the persistent infection with *Mycobacterium bovis* BCG. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 13 日 名古屋国際会議場
2. Sylvia Daim、河村伊久雄、原英樹、申艶娜、暮沼武士、光山正雄 *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein alters the early cytokine response of macrophages. 2009 年 3 月 13 日 名古屋国際会議場
3. Daim, S., Kawamura, I., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. Possible role of PPE37 protein in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 2 日 国立京都国際会館
4. Sakai, S., Kawamura, I., Uchiyama, R., Okazaki, T., and Mitsuyama, M. The PD-1:PD-L1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 2 日 国立京都国際会館
5. Kawamura, I., Kaku, T., Uchiyama, R., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. US-Japan Cooperative Medical Science Program The 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2008 年 7 月 8 日 米国メリーランド州ボルチモア市
6. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 BCG 持続感染の成立における PD-1/PD-L1 を介した抑制生シグナル伝達経路の関与 第 61 回日本細菌学会関西支部総会 2008 年 11 月 8 日 京都大学芝欄会館
7. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 結核菌および BCG の持続感染における免疫抑制受容体 PD-1 の役割 第 19 回日本生体防御学会 2008 年 7 月 12 日 北海道大学学術交流会館
8. 暮沼武士、角泰人、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 結核菌感染マクロファージのネクローシス誘導における病原遺伝子領域 RD1 の関与とその誘導機序について 2007 年 11 月 10 日 大阪大学銀杏会館
9. Daim, S., Kawamura, I., Mitsuyama, M. Possible role of PPE37 protein in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. 第 82 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 25 日 国立京都国際会館
10. 酒井俊祐、河村伊久雄、内山良介、光山正雄 PD-1/PD-L1 pathway inhibits Th1

- immune response during mycobacterial infection. 第 82 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 25 日 国立京都国際会館
11. 暮沼武士、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 結核菌病原遺伝子領域 RD1 が関与する IFN- γ 産生誘導機序の解析 2008 年 3 月 26 日 国立京都国際会館
 12. Uchiyama, R., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Tominaga, T., Sakai, S., Nomura, T., and Mitsuyama, M. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. 2007 年 11 月 21 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 13. Kurenuma, T., Uchiyama, R., Kawamura, I., and Mitsuyama, M. 結核菌の RD1 領域はミトコンドリア傷害と ATP 枯渇により感染マクロファージのネクロシス誘導に関与する 2007 年 11 月 21 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 14. Sakai, S., Kawamura, I., Uchiyama, R., and Mitsuyama, M., PD-1/PD-L1 pathway down-regulates Th1 immune response during mycobacterial infection. 2007 年 11 月 22 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 15. Mitsuyama, M., and Kawamura, I. Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce 1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. 2007 年 9 月 14 日 米国メリーランド州ボルチモア市
 16. 暮沼武士、内山良介、河村伊久雄、光山正雄 結核菌感染マクロファージのネクロシス誘導における病原遺伝子領域 RD1 の関与とその誘導機序 2007 年 7 月 26 日 九州大学西新プラザ
 17. 内山良介、河村伊久雄、光山正雄 結核菌細胞内侵入因子 Mce1A を介した A549 肺胞上皮細胞からのケモカイン産生誘導 2007 年 7 月 26 日 九州大学西新プラザ

[図書] (計 1 件)

1. 土屋晃介、河村伊久雄、光山正雄 (分担) 共立出版 蛋白質核酸酵素増刊「感染現象」細胞内寄生菌のマクロファージ内生存戦略 2009 年 p143-149.

[その他]

ホームページ

<http://bisei15.mb.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 伊久雄 (KAWAMURA IKUO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20214695