

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590453

研究課題名(和文) 結核菌糖脂質の抗原提示機構とサイトカイン応答の解析

研究課題名(英文) Antigen presentation and cytokine responses against mycobial glycolipids.

研究代表者

熊沢義雄 (Kumazawa Yoshio)

いわき明星大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：30072375

研究成果の概要(和文)：本研究は、モルモットサイトカインに対する単クローン抗体を作製し、モルモットを用いて結核菌糖脂質の抗原提示機構、サイトカイン応答および肺肉芽腫形成機構の解明を目的としている。モルモットの皮下にBCGを接種し、経時的に血清および脾細胞採取し、結核菌脂質抗原特異的抗体の測定と結核菌特異的T細胞応答について調べた。脂質抗原として*M. tuberculosis* H37Rv由来trehalose 6, 6'-dimicolate (TDM)、trehalose 6-monomicolate (TMM)、phosphatidylinositol mannoside (PIM)およびタンパク抗原として精製ツベルクリン (PPD)を用いた。BCG接種後2週目から8週目までの血清中には、PIMおよびPPDに対するIgGが検出されたが、TDMおよびTMM特異的抗体は検出されなかった。脂質抗原特異的T細胞の増殖応答を $[^3\text{H}]$ -thymidine による取り込みで測定したところ、TDM、PIMおよびPPD刺激に増殖応答が認められたが、TDM刺激に対する反応は弱かった。培養上清中のサイトカイン量を今回確立したサンドイッチELISAで測定した結果、PPD刺激した細胞では、IFN- $\gamma$ 産生が認められたが、TDMおよびPIM刺激の場合では検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study has aimed at the antigen presentation and cytokine responses against mycobacterial glycolipids using the guinea pig. Guinea pigs were inoculated intradermally with *M. bovis* BCG. Mycobacterial lipids specific serum IgG antibody titer was measured by ELISA. BCG-infected guinea pigs had IgG responses against PPD and phosphatidylinositol mannoside (PIM). Proliferation of T cells specific for mycobacterial lipids was estimated by tritiated-thymidine uptake. In BCG-infected guinea pig, splenic T cells showed proliferative responses to PPD, PIM and trehalose 6, 6'-dimicolate (TDM).

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2010年度 | 300,000   | 90,000    | 390,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

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：感染免疫

1. 研究開始当初の背景  
結核菌感染に際して、タンパク抗原に対する

T細胞反応については詳細に検討されているが、結核菌細菌壁重量のおよそ60%が脂質

成分で構成されており、結核菌の病原性を示す脂質抗原を含んでいる。しかし、脂質抗原に対するT細胞応答に関する知見は多くはなく、結核菌細胞壁を構成する脂質や糖脂質はCD1分子と結合し、キラーT細胞に抗原提示されることが明らかとなっている。ヒトCD1分子は、グループ1(CD1a、CD1b、CD1c)とグループ2(CD1d)に大別される。結核菌脂質抗原や糖脂質抗原のT細胞への抗原提示は、そのうちのグループ1に属するCD1分子群により行われる。グループ1CD1分子のうちCD1bが、mycolic acid、phosphatidylinositol mannoside (PIM)、lipoarabinomannan (LAM)等の脂質抗原をT細胞に抗原提示するのに必要な分子であることが分かっている。

## 2. 研究の目的

マウスは免疫応答の解析で広く使われている動物であるが、マウスで発現しているCD1分子はグループ2CD1分子のみであり、結核菌に対する防御応答を解析するモデル動物としてマウスは有用な動物ではないといえる。モルモットは、古くから結核菌の感染モデル動物として用いられている。モルモットは、ヒトのCD1b、CD1c、CD1e分子のホモログを発現しており、モルモットはマウスとは異なり、ツベルクリン遅延型過敏反応を観察できる点や、結核菌感染後期の肺において肉芽腫が形成される点など、ヒトと類似した症状を観察できる。モルモットをモデル実験とすることの最大の欠点は、モルモットの免疫系細胞やサイトカインに対する研究用抗体が非常に限られていることである。本研究では、細胞性免疫が重要とされている結核菌防御機構に重要なサイトカインであるIFN- $\gamma$ とIL-12に対する単クローン抗体(mAb)を作製し、サイトカイン定量系を確立し、モルモットを用いて結核菌糖脂質に対する免疫応答をサイトカイン応答の解析を行うことを目的として本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### 動物

Hartleyモルモットは、日本SLC(浜松)より3週齢の雌を購入し、1週間SPF環境下で予備飼育した後、実験に用いた。

### BCG接種

*Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur株)を $1.0 \times 10^7$  CFU/mlになるようにPBSで希釈し、モルモットの皮内に0.1 mlずつ接種し、7日後、14日後、21日後に解剖を行い、血清と脾臓を採取した。

### 血清中のTDM特異的IgG抗体価の測定

*M. tuberculosis* H37Rv株から抽出した

trehalose-6,6'-dimycolate (TDM)をhexaneで溶解し、1  $\mu\text{g}/\text{well}$ となるように96穴polysorp immuno plateに加え、1晩風乾することにより固層化した。血清をblocking bufferで段階希釈して加え、1時間インキュベートした。検出抗体としてHRP conjugate anti-guinea pig IgGをblocking bufferで1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、各穴に加えた。発色にはTMBを用いて、30分後に発色停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて540 nmを対比波長として405 nmの波長の吸光度を測定した。

### 脾細胞刺激

モルモット脾細胞を $4 \times 10^6$  cells/mlとなるように調製した。*M. tuberculosis* H37Rv株由来TDMをプレートに固層化したもの、PPD (Japan BCG Laboratory, Tokyo, Japan) 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにそれぞれ加えた。刺激した細胞、細胞培養上清を24、48時間後に回収した。

### T細胞の抗原特異的増殖応答の測定

96穴プレートで培養した脾細胞に、48時間後に $[^3\text{H}]$ -thymidine (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を18.5 kBq (0.5  $\mu\text{Ci}$ )ずつ各穴に加え、さらに8時間培養しパルスラベルした。Wallac 1490 Liquid Scintillation Counter (Turku, Finland)で計測した。

### RT-PCR

モルモット脾細胞はTrizol™を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAはTranscriptor First Strand cDNA Synthesis kitを用いてcDNAを合成した。cDNAを鋳型にしてTAKARA Ex taqを用いてPCRを行った。プライマーにはgpIFN- $\gamma$  (sense; GAC CTG AGC AAG ACC CTG AG, antisense; GCC ATT TCG CCT GAC ATA TT, 171 bp)、 $\beta$ -actin (sense; CCAACT GGG ACG ACA TGG AG, antisense; CGT AGC CCT CGT AGA TGG GC, 279 bp)を用いて94  $^{\circ}\text{C}$  30秒、57.5  $^{\circ}\text{C}$  1分、72  $^{\circ}\text{C}$  1分のサイクルを30サイクル行った。PCR産物を2%アガロースで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色し、UV照射下で写真を撮影した。

### サンドイッチELISA

精製抗体をELISAプレートに吸着させた。ブロッキング後、試料を添加し1時間インキュベートした。検出抗体としてビオチン化抗体を添加し1時間インキュベートした。洗浄後、streptavidin horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Zymed)を添加した。発色にはTMBを用いて、マイクロプレートリ

ーダーを用いて 450 nm の波長の吸光度を測定した。

#### 統計解析

統計解析は Scheffe's F test により行った。

#### 4. 研究成果

##### BCG 感染後の PPD および TDM 特異的抗体応答

モルモットの皮下に BCG を接種し、7 日後、14 日後、21 日後の血清を採取し、PPD および TDM 特異的な抗体価を測定した。感染後 14 日、21 日目に PPD 特異的抗体応答および TDM 特異的抗体応答共に増強していることが確認できた。

##### BCG 感染後の脾細胞における T 細胞の抗原特異的増殖応答

モルモットの皮下に BCG を接種し、7 日後、14 日後、21 日後の脾細胞を TDM、PPD、Con A で刺激し、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを指標として、T 細胞の増殖応答を測定した。PPD 刺激に対して、感染後 7 日後、14 日後、21 日後になるにつれ高い T 細胞の増殖応答が確認された。しかし、TDM に対する T 細胞の増殖応答の増強は認められなかった。

##### BCG 感染後のモルモット脾細胞のサイトカイン mRNA 発現誘導

モルモットの皮下に BCG を接種し、7 日後、14 日後、21 日後の脾細胞を TDM、PPD、Con A で刺激し、24 時間後回収した細胞の IFN- $\gamma$  mRNA 発現を RT-PCR で調べた結果、感染 7 日後、21 日後に PPD、Con A 刺激した細胞において IFN- $\gamma$  mRNA 発現が確認できた。TDM で刺激した細胞は感染 21 日後に IFN- $\gamma$  mRNA 発現が確認できた。

##### BCG 感染後のモルモット脾細胞培養上清中のサイトカイン誘導

モルモットの皮下に BCG を接種し、7 日後、14 日後、21 日後の脾細胞を TDM、PPD、Con A で刺激し、刺激した細胞培養上清を 24、48 時間後に回収し、サンドイッチ ELISA によりサイトカインを定量した結果、PPD 刺激した細胞培養上清において BCG 感染 14 日後、21 日後にかけて IFN- $\gamma$  産生が誘導されていることが認められた。TDM 刺激した細胞においては、IFN- $\gamma$  産生の誘導は観察できなかった。

#### 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. Takimoto H, Kato H, Kaneko M, Kumazawa Y. Amelioration of skewed Th1/Th2 balance in tumor-bearing and asthma-induced mice by oral administration of *Agaricus blazei* extracts. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(4):747-60.

2. Kaneko M, Takimoto H, Sugiyama T, Seki Y, Kawaguchi K, Kumazawa Y. Suppressive effects of the flavonoids quercetin and luteolin on the accumulation of lipid rafts after signal transduction via receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008;30(4):867-82.

3. Inoue J, Ideue R, Takahashi D, Kubota M, Kumazawa Y. Liposomal glycosphingolipids activate natural killer T cell-mediated immune responses through the endosomal pathway. *J Control Release*. 2009;133(1):18-23.

4. Kubota M, Takimoto H, Kaneko M, Inoue J, Kumazawa Y. Potentiation of murine innate immunity by alpha-galacturonosyl-type glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas yanoikuyae* and *S. terrae*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(3):363-9.

5. Kaneko M, Kanesaka M, Yoneyama M, Tominaga T, Jirillo E, Kumazawa Y. Inhibitory effects of fermented grape marc from *Vitis vinifera* Negroamaro on antigen-induced degranulation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(3):454-61. PubMed PMID: 20100066.

6. Tominaga T, Kawaguchi K, Kanesaka M, Kawaguchi H, Jirillo E, Kumazawa Y. Suppression of type-I allergic responses by oral administration of grape marc fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(4):593-9.

7. Kawaguchi K, Maruyama H, Hasunuma R, Kumazawa Y. Suppression of inflammatory responses after onset of collagen-induced arthritis in mice by oral administration of the Citrus flavanone naringin. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011 (in press).

8. Kawaguchi K, Matsumoto T, Kumazawa Y. Effects of Antioxidant Polyphenols on TNF-alpha-Related Diseases. *Curr Top Med Chem*. 2011 (in press).

9. Magrone T, Kumazawa Y, Jirillo E. Natural Antioxidants and their Derivatives: Biology and Clinical Application. *Curr Top Med Chem*.

2011 (in press).Apr 21.

[学会発表] (計4件)

1. 齋藤昂良、滝本博明、矢野郁也、熊沢義雄  
結核菌糖脂質 trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)による炎症誘導作用 第38回日本免疫学会総会学術集会(京都)2008.12.2 [日本免疫学会学術集会記録 第38巻:158]
2. 齋藤昂良、滝本博明、矢野郁也、熊沢義雄  
結核菌糖脂質 trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)による炎症誘導作用 第82回日本細菌学会総会(名古屋)2009.3.13 [日本細菌学雑誌 第64巻(1):191]
3. 齋藤昂良、滝本博明、矢野郁也、熊沢義雄  
結核菌糖脂質 trehalose 6, 6'-dimicolate による肉芽腫形成における IL-17 産生 $\gamma\delta$ 型T細胞の役割 第92回日本細菌学会関東支部総会(東京)2009.11.5 [第92回日本細菌学会関東支部総会講演抄録集 p.42]
4. 齋藤昂良、滝本博明、矢野郁也、熊沢義雄、服部雅一  
結核菌糖脂質 trehalose 6, 6'-dimicolate (TDM)による肉芽腫形成における $\gamma\delta$ 型T細胞の役割 第83回日本細菌学会総会(横浜)2010.3.29 [日本細菌学雑誌 第65巻(1):183]

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊沢 義雄 (Kumazawa Yoshio)  
いわき明星大学・薬学部・客員研究員  
研究者番号: 30072375

### (2) 研究分担者

滝本 博明 (Takimoto Hiroaki)  
北里大学・理学部・講師  
研究者番号: 00253534