

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293105

研究課題名(和文)結核菌肺感染局所へのT細胞ターゲティング機構の解明と新規ワクチン開発への応用

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of T cell targeting into Mycobacterium tuberculosis-infected lung and development of new lung-targeting vaccine strategy

研究代表者

松崎 吾朗 (Matsuzaki, Goro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：30229455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の結核菌感染肺への遊走に関するケモカインレセプター(CkR)の同定を試み、肺CD4+T細胞のCXCR3発現を認め、抗CXCR3抗体処理の結果からT細胞の感染肺への遊走には必須でないことが明らかとなった。一方、ケモカイン産生を誘導するインターロイキン(IL)-17を産生するT細胞を肺に誘導すると、BCGワクチン効果を増強したことから、IL-17が誘導するケモカインの重要性が示唆された。今後、T細胞の結核菌感染局所への遊走を細胞レベルで画像解析するため、蛍光タンパク発現遺伝子組換え結核菌を作成し、P3実験施設への導入した倒立蛍光顕微鏡培養装置の微速度撮影システムでの解析を開始した。

研究成果の概要(英文)：Analysis of chemokine receptors on CD4+ T cells migrated in the Mycobacterium tuberculosis-infected lung showed expression of CXCR3, but anti-CXCR3 mAb-treated mice suggested dispensable role of CXCR3 in the T cell migration. On the other hand, involvement of chemokines are suggested by enhancement of vaccine efficacy of BCG after inoculation of IL-17-inducing vaccine in the lung. Fluorescent protein-expressing M. tuberculosis was also developed to visualize interaction of T cell migration to infected microfoci by using fluorescent microscope incubator system introduced in P3 laboratory.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 肺感染 ケモカイン ケモカインレセプター T細胞 インターロイキン-17 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

肺結核は人類の健康に対する重大な脅威の一つであり、多剤耐性あるいは超多剤耐性結核菌の出現のため新規ワクチンの重要性が再認識されている。結核に対する予防に用いられている *Mycobacterium bovis* BCG 株 (BCG) が誘導する Th1 細胞は成人肺結核の予防には十分な効果を必ずしも示しておらず、次世代の抗肺結核ワクチンの開発が急務となっている。

肺結核に対する感染防御には、T 細胞の結核菌肺感染局所へのターゲティングとそれに引き続く成熟肉芽腫形成が重要と考えられる。この肉芽腫形成を伴う感染防御には結核菌抗原特異的 Th1 応答が中心的役割を果たす。一方、IL-17 が欠損した状態では、結核菌感染肺に Th1 細胞が感染細胞と正常に相互作用せず、成熟肉芽腫の形成と菌の排除が著しく低下した。IL-17 はケモカインなどの発現を誘導する炎症性サイトカインであるため、これらの分子が Th1 の感染局所へのターゲティングを規定すると推定された。しかし、肺感染局所への T 細胞ターゲティングを規定する分子は明確になっていない。

BCG 接種により誘導された Th1 細胞は肺結核に対しては予防効果が低いことが問題となっている。BCG 接種で誘導される Th1 細胞を肺結核感染局所にターゲティングできれば、強い感染防御を誘導するワクチン戦略になるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺結核感染局所への T 細胞ターゲティング機構を、特にケモカインレセプターとケモカインの役割、ならびに IL-17 の役割に注目して詳細に解明するとともに、その情報を応用して新規に肺結核に対するターゲティングワクチン戦略を開発することにある。そこで、

- (1) 感染肺への T 細胞動員を規定するケモカインレセプターとケモカインの検討、
 - (2) 肺への T 細胞の動員を可視化する解析システムの構築、
 - (3) 肺への T 細胞動員を誘導する新規抗肺結核ワクチン戦略の開発、
- の3点に焦点を当てて研究を進めた。そして、最終的には成人肺結核の予防に有効な新規ワクチンのプロトタイプの提案を目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物、感染およびリンパ球調整：野生型あるいはマイコバクテリア抗原 Ag85B 特異的 T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニック (P25 TCR Tg) C57BL/6 マウスおよび B6-Ly5.1 マウスを用いた。マウスに、経気道的に BCG を 5×10^6 CFU 接種し、4 週間後に肺を採取した。この肺より肺浸潤リンパ球を調整し、その表面形質を解析するとともに、一部の実験では C57BL/6 マウスあるいは P25 TCR Tg マウスの肺浸潤リンパ球を磁気分離

法を用いて CD4+T 細胞に分離し、 1×10^6 個を BCG 感染 B6-Ly5.1 マウスに養子移入し、2 日後のドナー Ly5.2+ CD4+ 肺浸潤 T 細胞の形質を検討した。

(2) フローサイトメトリー (FCM) および遺伝子発現解析：肺浸潤リンパ球を抗ケモカインレセプター抗体および抗 CD4、抗 Ly5.2 抗体で染色し、FACSCANTO の 8 color FCM により解析した。また、感染肺が発現するケモカイン遺伝子を real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で解析し、 $\Delta\Delta Ct$ 法で発現量を比較した。

(3) 肺組織培養：蛍光タンパク発現マイコバクテリアを肺接種したマウスに、BCG 感染 28 日の肺より得られた CD4+T 細胞を PK26 赤色蛍光色素でラベルして養子移入し、その 24 時間後に肺を切除し、培地を含む低融点アガロースを気管から注入して固化させた。これを約 100 μm のスライスとしてガラスボトムシャーレの底面に固定し、蛍光顕微鏡に設置した培養装置により培養しつつ微速度撮影観察を行った。

(4) 蛍光タンパク発現結核菌の作成：マイコバクテリア発現ベクター pNN2 を用いて緑色蛍光タンパク (EGFP)、あるいは赤色蛍光タンパク (DsRed または HcRed) を発現する BCG あるいは結核菌を作成した。

(5) IL-17 発現誘導によるワクチン増強効果の検討：マイコバクテリア抗原特異的 Th17 細胞を肺に誘導するため、コレラ毒素 (CT) と HBHA 抗原を混じて C57BL/6 マウスに経鼻的に接種し、その後に肺リンパ球の HBHA 特異的 IL-17 産生反応を検討した。また、BCG 皮下接種で一次免疫したマウスに HBHA + CT 経鼻接種で二次免疫し、その後に結核菌を肺感染させ、感染 14 日目の肺および肝臓内菌数をモニターした。

4. 研究成果

- (1) マイコバクテリア感染肺に分布する CD4+T 細胞が発現するケモカインレセプターならびに感染肺で発現されるケモカインのレパートリー解析
肺マイコバクテリア感染後に CD4+T 細胞が肺に動員される際に、ケモカイン/ケモカインレセプター相互作用が重要と推定された。そこで、感染肺に動員された CD4+T 細胞が発現するケモカインレセプターのレパートリーを検討した。BCG 肺接種 28 日目の野生型 C57BL/6 マウスの肺 CD4+T 細胞をマイコバクテリア抗原 PPD 及び抗原提示細胞とともに培養し、細胞表面のケモカインレセプター発現を FCM で検討した。その結果、比較的多くの細胞に認められたケモカインレセプターとして、CCR2, CCR4, CCR5, CCR6,

CXCR3, CXCR5が挙げられた(図1A)。また、インターフェロン(IFN)- γ 産生(Th1)細胞では相対的にCCR5, CXCR3, CXCR5を発現する細胞の割合が増加した(図1B)。

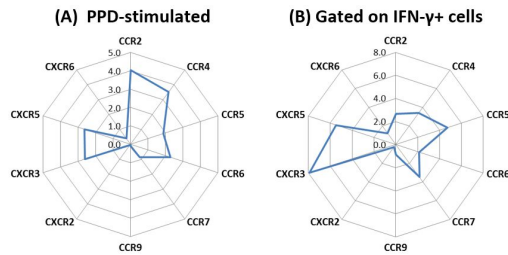


図1 BCG感染肺に誘導されるCD4+T細胞が発現するケモカインレセプター

一方、肺のケモカイン発現をRT-PCR法で解析したところ、BCG感染によりCCL5, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL13が増加したが、CCL2, CCL7, CCL12, CCL22の発現には大きな変化が認められず、CCL17は発現がやや低下した(図2)。

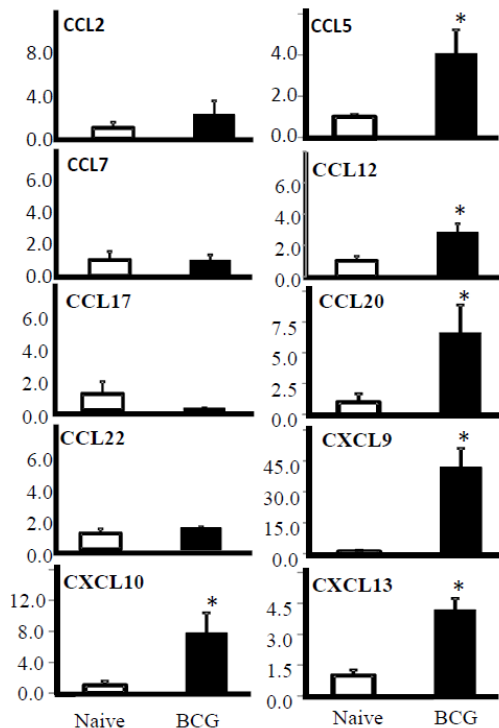


図2 BCG感染肺で発現が増加するケモカイン (*Naive群に比べBCG群でp<0.05の有意差)

上記の解析で増加が認められたケモカインレセプターとケモカインの組合せを検討すると(表1)、肺のマイコバクテリア抗原特異的Th1細胞ではCCR5-CCL5、CXCR3-CXCL9/10、CXCR5-CXCL13が、抗原特異的非Th1細胞ではCCR4-CCL5、CCR6-CCL20が肺への動員に与える可能性が考えられた。CXCR5は濾胞ヘルパーT(T_{fh})細胞に発現されることが報告されているため、IFN- γ +CXCR5+細胞は感染細胞の分布する局所ではなく感染肺に形成されるリンパ濾胞様構造に分布する細胞と推定された。従って、感染局所への分布に係るケ

モカインレセプターとケモカインの組合せとしてCCR5-CCL5、CXCR3-CXCL9/10が特に有力と考えられた。

	CkR	Ck
lung Th1	CCR5	CCL5
	CXCR3	CXCL9, CXCL10
	CXCR5	CXCL13
Lung T	CCR2	none
	CCR4	CCL5
	CCR5	CCL5
	CCR6	CCL20
	CXCR3	CXCL9, CXCL10
	CXCR5	CXCL13

表1 BCG感染肺で発現されたケモカイン(Ck)とCD4+T細胞の発現するケモカインレセプター(CkR)の関係

(2) マイコバクテリア感染肺に動員されるマイコバクテリア抗原特異的CD4+T細胞の発現するケモカインレセプターのT細胞養子移入法による検討

上記の解析より、肺に分布するCD4+T細胞の発現するケモカインレセプターのレパートリーが明らかとなった。次に、末梢血から肺に動員される結核菌抗原特異的CD4+T細胞の発現するケモカインレセプターを確認するために、マイコバクテリア抗原特異的T細胞レセプターのみを発現するP25 TCR TgマウスにBCGを肺接種し、28日目の肺CD4+T細胞を、BCG肺感染させたB6-Ly5.1マウスに養子移入した。2日後に肺に分布す

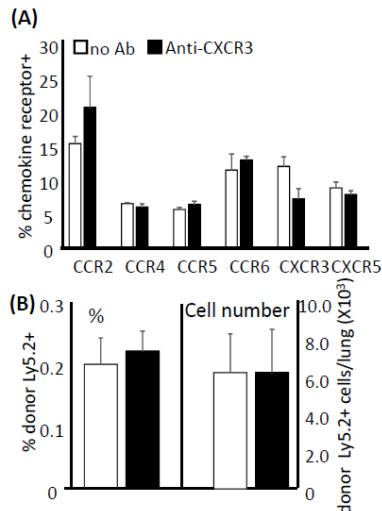


図3 BCG感染肺に動員されたドナーP25 TCR Tg T細胞が発現するケモカインレセプターおよび抗CXCR3抗体処理の効果

るドナーP25 TCR Tgマウス由来Ly5.2+CD4+T細胞のケモカインレセプター発現を検討した結果、野生型感染マウスを用いた実験と同じく、CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR3, CXCR5の発現が認められた(図3A)。

感染局所への動員に關与するケモカインレセプターの候補として、CCR5 および CXCR3 の關与が推定されたため、養子移入の際に、抗 CXCR3 抗体を同時に投与することにより CXCR3 と CXCL9/10 の相互作用をブロックした。予想に反して、肺に動員される P25 TCR Tg マウス由来 T 細胞の数は変化しなかった (図 3 B)。一方、CXCR3 陽性細胞数は有意に低下したことから (図 3 A)、抗 CXCR3 抗体は有効に CXCR3+細胞の動員をブロックできたと考えられた。従って、マイコバクテリア抗原特異的 CD4+T 細胞の肺への動員は、単独のケモカインレセプターにより制御されるのではなく、複数のケモカインレセプターが關与する可能性が考えられた。

マイコバクテリア感染肺での有効な免疫応答に必須である IL-17 が複数のケモカイン発現に關与することから、マイコバクテリア感染肺への CD4+T 細胞誘導を規定するのは、IL-17 で誘導されるものを含む複数のケモカインとそのレセプターの総和と考えられた。

(3) CD4+T 細胞の感染細胞への動員を解析する肺組織培養の蛍光観察システムの構築

肺から T 細胞を分離し解析する方法では、T 細胞と感染細胞の相互作用を可視化することができない。この点を改善するために、以下の技術開発を行った。

まず、肺組織内での細胞の動きを可視化するため、緑色蛍光タンパク EGFP を発現する BCG を接種したマウスに赤色蛍光色素でラベルした肺浸潤 T 細胞を養子移入し、24 時間後に肺を摘出してそのスライスを作成し、組織培養を行いながら緑色と赤色の蛍光色素の動態を 5-10 時間にわたり微速度撮影する方法を、当研究センターの P2 実験室に設置されている倒立型共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて構築した。その解析の結果、EGFP 陽性の BCG 感染細胞に接着する赤色蛍光陽性 T 細胞 (図 4 の白丸で示す) は観察中に大きな動きを示さず、一方 BCG 感染細胞と接触していない細胞 (黄色で局在と軌跡を示す) は大きな運動を示した (図 4)。従って、この組織培養システムは T 細胞とマイコバクテリア感染細胞の相互関係を短時間モニターするシステムとして使用可能なこと、細胞の養子移入後 24 時間ではすでに T 細胞と感染細胞の安定した接着が成立していることが判明した。今後はこのシステムを応用して、試験管内で T 細胞を加えて感染細胞と相互作用する培養系に改変し、その相互作用におけるケモカインの役割を中和抗体を用いて検討する予定である。

次に、結核菌を用いて同様な解析を行うシステムを構築するために、蛍光タンパクとして EGFP、DsRed、または HcRed を発現した結核菌を作成した。また、当研究センターの P3 実験室にて蛍光色素発現結核菌に感染した肺組織を微速度撮影で観察するため、蛍光顕

微鏡システム一式を新たに導入した。現在、このシステムを用いた結核菌感染肺の観察システムを構築中である。

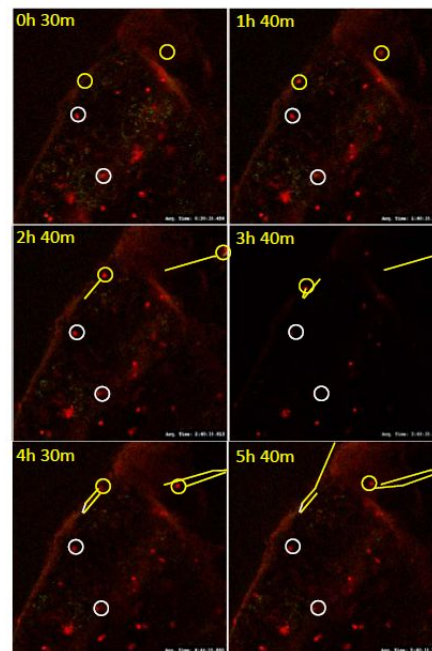


図4 BCG感染肺組織培養中のT細胞の動態。BCG感染細胞の近傍に認められるT細胞の例を白丸で、感染細胞に近接しないT細胞の例を黄丸で囲み、後者の細胞の動きを黄線で示す。約1時間ごとの蛍光画像を示す。

(4) IL-17 誘導ワクチンによる BCG ワクチン効果の増強

IL-17 がケモカイン産生の誘導を介してマイコバクテリア感染肺へのマイコバクテリア抗原特異的 CD4+Th1 細胞の誘導に重要な役割を果たすと考えられた。そこで、BCG の肺結核に対するワクチン効果を増強する方法として、IL-17 を産生するマイコバクテリア抗原特異的 CD4+Th17 細胞を肺に誘導するワクチンの有効性を検討した。CT に混じたマイコバクテリア抗原 HBHA を経鼻的に肺接種すると、肺に HBHA 特異的 IL-17 産生反応が増強し (図 5 A) 結核菌を肺感染後も維持されていた (図 5 B)

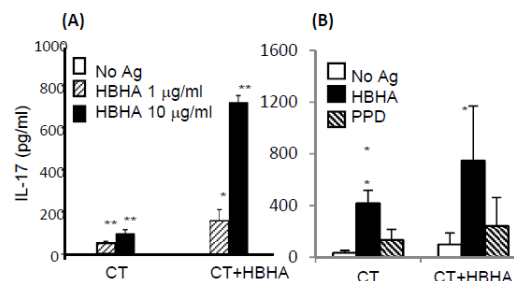


図5 HBHA+CT経鼻免疫によるHBHA特異的Th17誘導

次に、BCG 皮下接種で全身性にマイコバクテリア抗原特異的 Th1 細胞を誘導したマウス CT+HBHA 経鼻免疫を加え、結核菌を肺感染 14 日後に肺および肝臓の菌数を計測した。その結果、BCG 単独接種群に比べて、BCG 接種に CT+HBHA 経鼻接種を追加した群では有

意に肺内菌数の低下が認められた。残念ながら、肺での防御免疫増強は感染4週目では確認されなくなり、今後はより持続する肺免疫増強法の検討が必要と考えられた。

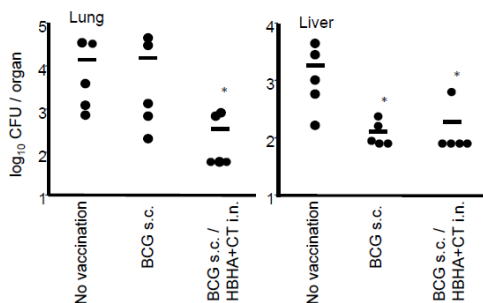


図6 BCG皮下免疫後のHBHA+CT経鼻免疫による肺の抗結核感染防御能の増強

今回の研究から、マイコバクテリア肺感染で肺に誘導されるCD4⁺T細胞の発現するケモカインレセプターおよび感染肺のケモカインの組合せが明らかになり、またその中でも重要と推定されたケモカインレセプターCXCR3が単独ではCD4⁺T細胞の肺への動員を制御しえないことが明らかとなった。すなわち、T細胞の肺への動員では複数のケモカイン-ケモカインレセプターの相互作用により確実な防御が担保されているものと考えられた。また、組織培養の蛍光観察の結果から、肺でのT細胞と感染細胞の相互作用は少なくとも10時間程度は安定したものであることも明らかとなった。さらに、IL-17によるケモカイン産生を増強する目的で、肺に結核菌抗原特異的Th17細胞を誘導することにより、BCGワクチン効果が増強できることも明らかとなった。これらの結果は、今後の肺結核に有効なワクチンを設計するうえで重要な基盤の情報となると期待される。

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 5件)

- Okita Y, Shiono T, Yahagi A, Hamada S, Umemura M, Matsuzaki G. Interleukin-22-Induced Antimicrobial Phospholipase PLA2G2A Mediates Protective Innate Immunity of Non-hematopoietic cells against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2016 Feb 84(2):573-579. doi:10.1128/IAI.01000-15.
- Inafuku M, Matsuzaki G, Oku H. Intravenous *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in obese, diabetic *ob/ob* mice. *PLoS One* 2015. Jun 3;10(6): e0128676. Doi10.1371/journal.pone.0128676. eCollection 2015.
- Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung S-Y, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y,

Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2⁺ Vγ6⁺ γδ T cells. 2015 Jun 25 *Nat Commun.*;6:7464. doi: 10.1038/ncomms8464.

Umikawa M, Umikawa A, Asato T, Takei K, Matsuzaki G, Kariya K. Angiopoietin-like protein 2 induces drastic proinflammatory responses in peritoneal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Nov 13;467(2):235-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.183.

Fukui, M, Shinjo K, Umemura M, Harakuni T, Arakawa T, Matsuzaki G. Enhanced effect of BCG vaccination against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice with lung Th17 response to mycobacterial HBHA antigen. *Microbiol. Immunol.* 2015 Dec;59(12):735-743. doi: 10.1111/1348-0421.12340.

[学会発表](計 17件)

梅村正幸, 松崎吾朗 Interleukin-17 サイトカイン・ファミリーの肺結核に対する防御免疫への関与。WS1 サイトカインと生体防御のアップデート。(松崎、座長) 第89回日本細菌学会総会、2016年3月23-25日、大阪 大阪国際交流センター Fukui M, Fukui C, Nakae S, Matsuzaki G, Umemura M. Role of IL-33 on innate immunity in pulmonary mycobacterial infection. 2015年11月18-20日、札幌 札幌コンベンションセンター

松崎吾朗, 福井 雅之, 當山 清悟, 中江 進, 岩倉 洋一郎, 梅村正幸. 肺胞上皮細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-17F の結核菌に対する防御免疫への関与. 第27回日本比較免疫学会、2015年8月21-23日、小浜 小浜市働く婦人の家

梅村正幸, 福井雅之, 山崎雅俊, 福井知穂, 照屋尚子, 中江進, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染におけるインターロイキン(IL)-33の関与. 第85回実験結核研究会、2015年3月26日、長崎 長崎ブリックホール

山崎雅俊, 梅村正幸, 福井雅之, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染肺へのCD4⁺T細胞の動員に関するケモカイン/ケモカインレセプターの同定 第88回日本細菌学会総会、2015年3月26-28日、岐阜 長良川国際会議場

梅村正幸, 福井雅之, 當山清悟, 山崎雅俊, 福井知穂, 照屋尚子, 田村敏生, 中江進, 岩倉洋一郎, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染におけるIL-17F産生細胞

の同定 .第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 - 28 日、岐阜 長良川国際会議場

Hiromitsu Hara, Eiichi Iizasa, Mio Kubota, Takayuki Uematsu, Hideyasu Kiyohara, Sho Yamasaki, Goro Matsuzaki, Hiroki Yoshida. Innate immune sensing and response to mycolic acid-containing lipids in Mycobacteria. 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 - 28 日、岐阜 長良川国際会議場

梅村正幸、福井雅之、當山清悟、福井知穂、照屋尚子、田村敏生、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗 . 結核菌感染における IL-17F 産生細胞の特性と局在性 . 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28 日、東京 タワーホール舟堀

松崎吾朗、沖田大和、浜田聡、梅村正幸 . IL-22 が誘導するヒト Phospholipase A2 Group IIA (PLA2G2A) による *Listeria monocytogenes* 感染防御 . 第 25 回日本生体防御学会学術総会、2014 年 7 月 9-11 日、仙台 東北大学片平さくらホール

Masayuki Umemura, Masayuki Fukui, Msatashi Yamasaki, Chiho Fukui, Susumu Nakae, Toshiki Tamura, Goro Matsuzaki. Involvement of IL-33 in the protective immunity against lung mycobacterial infection. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都 京都国際会議場

Eiichi Iizasa, Takauki Uematsu, Mio Kubota, Hideyasu Kiyohara, Yasuchi Chuma, Goro Matsuzaki, Sho Yamasaki, Hiroki Yoshida, Hiromitsu Hara. Innate recognition of mycolic acid-containing lipids in mycobacteria. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都 京都国際会議場

梅村正幸、福井雅之、福井知穂、中江進、松崎吾朗 . IL-33 のマイコバクテリア感染防御免疫に対する増強効果 第 25 回日本生体防御学会学術総会、2014 年 7 月 9-11 日、仙台 東北大学片平さくらホール

福井雅之、梅村正幸、松崎吾朗 . 新規抗肺結核ワクチン戦略による早期防御免疫の増強 第 25 回日本生体防御学会学術総会、2014 年 7 月 9-11 日、仙台 東北大学片平さくらホール

Umemura M, Touyama S, Fukui M, Fukui C, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Identification of IL-17F-producing cells during mycobacterial infection. 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 - 13 日、千葉 幕張メッセ

Iizasa E, Uematsu T, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H. Identification of an ITAM-coupled pattern recognition receptor that recognize the mycobacterial cell wall component mycolic acid. 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 - 13 日、千葉 幕張メッセ

Fukui M, Umemura M, Miyata T, Harakunim, T, Arakawa T, Matsuzaki G. Induction of early protective immunity against pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in mice by combination of BCG priming vaccine and boosting mucosal vaccine with a recombinant mycobacterial antigen. 第 42 回日本免疫学会総会、2013 年 12 月 11 - 13 日、千葉 幕張メッセ

梅村正幸、當山清悟、福井雅之、福井知穂、中江進、岩倉洋一郎、松崎吾朗 . マイコバクテリア感染肺における IL-17F 産生細胞の同定とその局在性 . 第 24 回日本生体防御学会学術総会、2013 年 7 月 10 - 13 日、熊本 くまもと森都心プラザ .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)
〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 吾朗 (Matsuzaki, Goro)
琉球大学熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号 : 30229455

(2) 研究分担者

梅村 正幸 (Umemura, Masayuki)
琉球大学熱帯生物圏研究センター・准教授
研究者番号 : 90359985

大原 直也 (Ohara, Naoya)
岡山大学医歯学総合研究科・教授
研究者番号 : 70223930

新川 武 (Arakawa, Takeshi)
琉球大学熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号 : 50305190
(平成 25,26 年度)

(3) 連携研究者なし