

第87回総会教育講演

I. 結核菌による宿主感染防御の発現制御

河村伊久雄

要旨：結核菌はマクロファージに貪食された後、ファゴソームとリソソームの融合を阻害することにより細胞内で生存・増殖する。また、感染細胞の細胞死が結核菌の細胞内増殖に影響を及ぼすことが示されているが、最近の研究でそれらの分子メカニズムが明らかになってきた。さらに、結核菌を感染させたマウスには強い感染防御免疫が発現し、菌の増殖を抑えることができるが、結核菌の持続的な感染は宿主に過剰な免疫応答を誘発し、その結果肉芽腫内部の空洞化や感染局所周辺の正常組織が傷害される。これらの点から、結核に対する感染防御機構を効率よく発揮させるためには、菌の排除に関与するTh1型免疫応答に加えて、その反応を適度に制御するための抑制性機序が重要となる。最近、活性化CD4⁺T細胞上に発現する免疫補助因子programmed cell death 1 (PD-1)が結核に対する防御免疫の制御に関与することが示されている。本稿では、結核菌のマクロファージによる細胞内殺菌に対する抵抗性と、PD-1分子を介した防御免疫応答の発現制御に関する最新の知見を紹介する。

キーワード：結核菌, BCG, マクロファージ, ファゴソーム, ファゴリソソーム, アポトーシス, ネクローシス, オートファジー, PD-1

はじめに

WHOによると、現在世界人口の約3割が結核に感染しており、2010年には年間約880万人の結核患者が発生し、結核による死亡者数は約150万人に上ると報告されている (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)。このような現状から、結核は今なお単一の病原体による最大の感染症といえる。わが国では、1950年代以降結核発症率の著しい改善をみているが、欧米先進国と比較すると今なお新規罹患率は米国の約5倍、欧米主要国の数倍あることから、結核の低蔓延状態が続いているといえることができる。さらに、多剤耐性結核菌の出現頻度の増加や、結核発症率が高いアジア・アフリカ地域の発展途上国からの人的流入などにより、今後わが国における結核の増加が懸念される。

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、宿主体内に侵入後マクロファージに取り込まれるが、ファゴリソソーム融合の阻害や、細胞死を制御することでマクロファージ内での生存増殖を可能にしている。一方、結核菌の感

染は宿主自然免疫応答を刺激し、感染早期に非特異的防御反応を惹起する。また、それが引き金となり感染数週間後にはTh1型感染抵抗性T細胞の分化が誘導され、結核菌に対する感染防御免疫が出現する。感染抵抗性T細胞はinterferon- γ (IFN- γ) やtumor necrosis factor- α (TNF- α)などを産生してマクロファージを活性化する。その結果、感染抵抗性T細胞が誘導されるとマクロファージの細胞内殺菌能が飛躍的に高まり、菌の増殖を阻害できるようになる。しかし、結核菌に対する免疫応答が過剰に誘導された場合には、付随的に正常組織までが破壊され、結核に特有な感染病像が出現する。一方、加齢に伴ってT細胞上のcostimulatory分子やインテグリンの発現量の低下、あるいはメモリーT細胞プールが減少することが報告されており、こうしたT細胞機能の質的および量的な低下が結核に対する抵抗性を減弱させ、結果として高齢者における結核の高い罹患率に結びつくものと考えられる¹⁾²⁾。このように、結核に対する感染防御においては防御免疫応答の発現を適切にコントロールすることが重要な要素となる。しかし、結核菌は感染細胞の機能を修飾

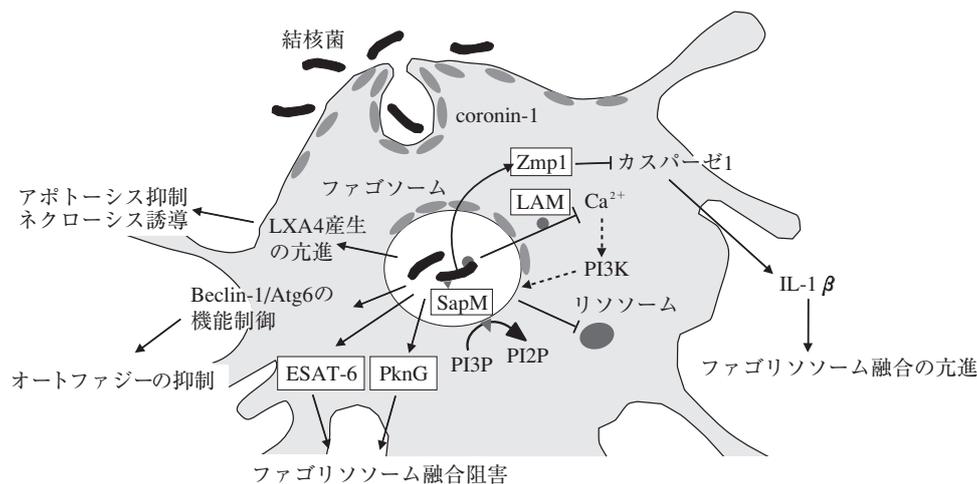


図1 結核菌のマクロファージ細胞内殺菌抵抗性機序

結核菌は、ファゴリソソーム融合を阻害するための様々なメカニズムを有している。結核菌はリピッドフォスファターゼである SapM を産生し、ファゴソーム膜上の PI3P を脱リン酸化する。また、結核菌細胞壁成分の LAM は、PI3K のファゴソームへの集積を抑制することでファゴリソソーム融合阻害に関与する。結核菌が産生するメタロプロテアーゼである Zmp1 は、カスパーゼ1の活性化を阻害することで IL-1 β 依存的に誘導されるファゴリソソーム融合を阻害する。また、VIII型分泌装置より分泌される ESAT-6 やプロテインキナーゼ活性がある PknG もファゴリソソーム融合阻害に関与する。さらに、結核菌は感染細胞の coronin 1 分子をファゴソーム膜上に維持することで、リソソームとの融合を阻害することが示されている。一方、結核菌は Beclin-1/Atg6 の機能を阻害することでオートファジーの誘導を抑制し、lipoxin A4 (LXA4) の合成を亢進させることで感染細胞のアポトーシスの誘導を抑えている。

する様々な機序を有することが最近研究で明らかにされており、それが菌の強い抵抗性の主要な原因と考えられている。本稿では、結核菌のマクロファージ細胞内殺菌に対する抵抗性機序と、最近明らかにされた CD28/CTLA-4 ファミリー分子に属する programmed cell death 1 (PD-1) 分子を介した防御免疫応答の発現制御に関する最新の知見を紹介する。

結核菌に対するマクロファージ細胞内殺菌機構とその制御

結核菌は宿主体内に侵入後、肺マクロファージ、樹状細胞 (dendritic cell, DC) あるいは単球に貪食される。その際、マクロファージ表面の補体レセプター、マンノースレセプター、フィブロネクチンレセプターあるいはスカベンジャーレセプターなどが菌の取り込みに関与する³⁾。しかし、これら細胞表面レセプターを介した菌の取り込みは、マクロファージの殺菌機構や、感染防御に関与する Th1 型サイトカイン産生を刺激しないことが示されている⁴⁾⁵⁾。また、結核菌は菌体表面の mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A) や mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) を介して非貪食細胞である肺上皮細胞に侵入することができる⁶⁾⁷⁾。感染した病原体を排除する能力に欠ける上皮細胞への侵入は、結核菌の宿主体内での長期生存を容易にするものと考えられる。

マクロファージに取り込まれた菌はスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ産生、およびファゴソーム内 pH の酸性化を抑制して初期ファゴソーム内での殺菌に抵抗する。通常、細菌貪食後に形成されたファゴソームはリソソームと融合してファゴリソソームが形成される。このファゴリソソーム内の環境は結核菌にとっても殺菌的である。しかし、結核菌はファゴリソソーム融合を阻害することができる (図1)⁸⁾。結核菌のファゴリソソーム融合抑制には、細胞壁主要成分のリポアラビノマンナン (lipoarabinomannan, LAM) とリピッドフォスファターゼである SapM が重要な役割を果たしている⁹⁾。ファゴソームとリソソームの融合にはフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) によりファゴソーム膜上に合成されるフォスファチジルイノシトール3-リン酸 (PI3P) が重要な役割を果たすが、菌体から遊離した LAM は細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を抑えることで PI3K のファゴソームへの集積を抑制し、ファゴソーム膜上の PI3P の合成を阻害する。また、結核菌はリピッドフォスファターゼである SapM を産生して PI3P の脱リン酸化を引き起こし、ファゴリソソーム形成を抑制している¹⁰⁾。さらに、結核菌はスフィンゴシンキナーゼの活性を抑制し、小胞体からの Ca²⁺ 流出を抑えることでファゴソームの成熟過程を阻害することが示されている¹¹⁾¹²⁾。また、結核菌由来の Zn²⁺ メタロプロテアーゼ Zmp1 は、インフラマソーム形成を抑制することで IL-1 β 依存的なファゴリソソーム

融合を阻害する¹³⁾。さらに、結核菌はファゴソーム内でプロテインキナーゼG (PknG) を産生してリソソームのファゴソームへの輸送を阻害することができる¹⁴⁾¹⁵⁾。その他、*Rv1506c*や*moeB1*などの結核菌因子がファゴリソソーム融合阻害に関与することが報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、結核菌がマクロファージに貪食され、ファゴソームが形成されると、そのファゴソーム膜上には coronin 1分子が集積する。結核菌には集積した coronin 1をファゴソーム膜から解離しないように維持する活性がある。そのため、細胞質内のCa²⁺依存性脱リン酸酵素 calcineurinが活性化され、結核菌を含むファゴソームとリソソームの融合が阻害されることが示されている¹⁸⁾。また、結核菌には5種類のⅦ型分泌装置があり、そのうちのearly secretory antigenic target 6 (ESAT-6) system 1 (ESX-1)はファゴリソソーム融合阻害に関与している¹⁷⁾。ESX-1を介して分泌されるESAT-6がファゴソーム膜を傷害することによりファゴリソソーム融合阻害や、菌の細胞質へのエスケープが可能になるものと考えられる¹⁹⁾²⁰⁾。さらに最近、ESAT-6によるファゴソーム膜の傷害は、オートファジーの誘導にも関与することが示されている²¹⁾。オートファジーは、細胞の恒常性維持に必要と考えられてきた機構であるが、結核菌を感染させたマクロファージにオートファジーを誘導すると、細胞内菌数が減少することが明らかにされた。この結果は、オートファジーが結核菌の細胞内殺菌にも関与することを示すものである²²⁾²³⁾。最近、このオートファジーの誘導にはSTINGが重要な役割を果たしていることが示されている。結核菌が産生するESAT-6によりファゴソーム膜が傷害されると、結核菌に由来するDNAで刺激されるSTING依存的なシグナル経路が活性化され、感染細胞のアポトーシスが誘導される²¹⁾。一方、結核菌はBeclin-1/Atg6の活性を制御することでオートファジーを阻害してこの殺菌機序に抵抗している²⁴⁾²⁵⁾。これらに加えて、感染マクロファージがアポトーシスに陥ると結核菌の細胞内増殖が抑制され、カスパーゼ阻害剤を用いてアポトーシスを阻害すると菌の細胞内増殖が回復することから、感染細胞のアポトーシスは結核菌に対する宿主側の初期防御反応と捉えることができる。しかし、結核菌強毒株は感染マクロファージのアポトーシスを抑制する機序を有している²⁶⁾²⁷⁾。これは、結核菌が感染細胞のlipoxin A4 (LXA4)合成を亢進させるためである。合成されたLXA4はシクロオキシゲナーゼ2の活性を抑制するためプロスタグランジンE2の合成が抑えられ、その結果感染細胞はアポトーシスではなく、ネクローシスに陥るようになる²⁸⁾。このように結核菌は様々なレベルで細胞内殺菌機序に対して抵抗する能力を有している。また、菌の病原性と感染細胞の細胞死制御の間には明確な関連性があり、結核菌は細胞

内生存・増殖を可能にするためにアポトーシスやオートファジーを阻害し、細胞外に出て感染を拡大するためにネクローシスを誘導するのである。

さらに感染が進むと、感染巣部には肉芽腫が形成される。これは感染の拡大を防ぐための一種の封入組織であり、菌を貪食したマクロファージを中心にその周りをランゲルハンス巨細胞やリンパ球が取り囲んだ構造をしている。肉芽腫内部、あるいは宿主組織内は酸素分圧が低く、偏性好気生菌である結核菌には非常に苛酷な環境と考えられる。しかし、結核菌はグリオキシル酸サイクルの酵素であるイソクエン酸リアーゼの発現を亢進させ、酸素分圧の低い環境では脂質を炭素源として利用することでその環境に適応して増殖することができる²⁹⁾。

結核菌に対する感染防御免疫応答

マクロファージやDCは細胞表面のToll-like receptor 2 (TLR2)を介して結核菌の主要な細胞壁リポ多糖体成分であるリポアラビノマンナン (LAM), フォスファチジルイノシトールマンノシド (phosphatidylinositol mannoside, PIM)あるいは19 kDaリポタンパク質を認識する。また、TLR4やTLR9は易熱性結核菌体抗原や細菌DNAを識別することが示されている。さらに、NOD-like receptorsやC-type lectinなどの自然免疫に関与する種々の受容体分子が結核菌菌体成分を認識してそれぞれのシグナル経路が活性化される³⁰⁾。その結果、マクロファージやDCからの炎症性サイトカイン産生が誘導される。また、19 kDaリポタンパク質によるTLR2の刺激はマクロファージにアポトーシスを誘導することや、TLR4リガンドの刺激が、オートファジーを誘導することが最近明らかとなり、これら結核菌成分とTLRの会合が、アポトーシスやオートファジー経路を介した初期防御反応の誘導にも関与することが示唆されている³¹⁾³²⁾。一方、病原性の強い結核菌やBCGのLAMの先端にはマンノース残基が付加されており (Man-LAM), 非結核性抗酸菌のLAMとは構造的に異なる。この結核菌細胞壁に存在するMan-LAMはTLR2によって認識されず、これが結核菌の病原性発現メカニズムの一つと考えられる³³⁾。結核菌に対する初期防御には細胞壁糖脂質成分であるtrehalose-6,6'-dimycolate (TDM)のmacrophage inducible C-type lectin (Mincle)による識別が重要であり、その結果として強い炎症反応や一酸化窒素産生あるいは肉芽腫形成が誘導される³⁴⁾。活性化したマクロファージはRANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted), macrophage migration inhibitory protein 1- α (MIP1- α), MIP2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), MCP-3, MCP-5, IP-10などのケモカインを産生し、感染局所への炎症性細胞を動因する。また、感染マクロファージが産

生するサイトカインのうち、TNF- α 、IL-1、IL-12やIL-18はマクロファージを活性化し、肉芽腫形成や感染初期の菌の増殖を抑制すると共に、ナチュラルキラー（NK）細胞あるいは $\gamma\delta$ 型T細胞からのIFN- γ 産生を誘導する重要な役割を担っている。産生されたIFN- γ はTNF- α と共にマクロファージを活性化し、殺菌活性の非常に強いNO産生を誘導して貪食した菌を殺菌処理する。また、このIFN- γ は感染防御を司るT細胞の分化因子としても作用する。さらに、感染初期の肺ではIL-23依存的に $\gamma\delta$ 型T細胞により産生されたIL-17がT細胞からのIFN- γ 産生や肉芽腫形成に関与していることが明らかにされている^{35)~37)}。

結核菌を貪食したマクロファージやDCが産生するIL-12やIL-18、あるいはNK細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞由来のIFN- γ は、IFN- γ 産生能を有する感染抵抗性Th1細胞を誘導する。このT細胞の分化誘導には、抗原提示細胞としてDCが重要な役割を果たしている。一方、結核菌はこのDCの機能を抑制する活性を有することが示されている³⁸⁾。Th1に分化した $\alpha\beta$ 型T細胞は、抗原およびIL-18の刺激を受けて大量のIFN- γ を産生する。このため、感染防御を担うT細胞が出現するとマクロファージの殺菌能が飛躍的に亢進する。感染防御に関与するT細胞としては、class II拘束性CD4⁺Th1細胞ばかりではなく、class I拘束性CD8⁺キラーT細胞も同時に誘導される。ファゴソーム内で処理された細菌由来の抗原は通常class II分子に結合してT細胞に抗原提示されるため、CD4⁺Th1型T細胞により認識される。しかし、細胞質に存在する細菌由来抗原はプロテアソームにより消化された後class I分子と会合するため、CD8⁺T細胞による認識を受ける。結核菌感染により誘導されるCD8⁺T細胞は、CD4⁺T細胞と同様IFN- γ を産生すると同時に、多量の菌を貪食して殺菌能の低下したマクロファージや菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、新たに動員されてくる活性化マクロファージに菌を処理させるという機構で感染防御に関与すると考えられる。また、CD8⁺キラーT細胞は、結核菌感染細胞を傷害することで内部の菌を殺菌することができ、細胞質顆粒中に含まれるパーフォリンとグラニューライシンがこの殺菌メカニズムに関与することが示されている³⁹⁾。さらに、タンパク質以外のLAM、PIM、グルコースモノマイコレート（glucose monomycolate）やイソプレノイドグリコリピッド（isoprenoid glycolipids）などの糖脂質成分がマクロファージ上のCD1分子に結合し、CD8⁺あるいはdouble negative T細胞に抗原として提示される⁴⁰⁾。これらを認識するCD1拘束性T細胞は、抗原刺激後にIFN- γ 産生やキラー活性を発揮することで防御免疫に関与することが示されている。また最近、IL-17産生性T細胞がCXCL9、CXCL10やCXCL11

の産生を介して、感染局所へのIFN- γ 産生性T細胞の動員に関与することが示された⁴¹⁾。このように、防御免疫の発現にはその機能あるいは認識する抗原が異なる多様なT細胞が関与する。それぞれのT細胞の防御免疫における比重は異なると考えられるが、これらT細胞活性の総和が結果的に結核菌に対する宿主の抵抗性を決定している。

BCGおよび結核菌に対する感染防御免疫のPD-1を介した制御機序

PD-1は、アポトーシスに陥ったT細胞の表面抗原として1992年に石田らにより同定された⁴²⁾。その後の解析から、PD-1は活性化したT細胞やB細胞に発現すること⁴³⁾。また、機能不全に陥ったCD4⁺T細胞には恒常的に発現していることが示された⁴⁴⁾。さらに、PD-1はレセプターとしての機能を有し、2種類の特異的リガンド（PD-L1とPD-L2）が存在することが明らかとなった。それらリガンドのうち、PD-L1は多様な細胞に発現が認められるが、PD-L2は活性化した樹状細胞やマクロファージに発現する⁴⁵⁾。さらに、抗原提示細胞上のPD-L1の発現は、IFN- γ やTLRリガンドの刺激により亢進することが報告されている⁴⁶⁾。PD-1経路の機能解析から、抗原提示細胞がT細胞に抗原を提示する場合に、PD-1とPD-1特異的リガンドの結合は、T細胞に抑制性シグナルを伝達することが明らかにされている。この抑制性シグナルは、末梢組織において自己免疫反応を抑制するための免疫寛容を維持するために重要である⁴⁷⁾。一方、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（lymphocytic choriomeningitis virus）、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus）やB型肝炎ウイルス（hepatitis B virus）などの慢性ウイルス感染では、PD-1を介した抑制性シグナルが病原体の排除を阻害することが示されている^{48)~50)}。これらの実験成績は、PD-1シグナル経路がT細胞の活性化を制御して組織傷害を抑えるための重要な役割を果たしていることを示すものであるが、逆に慢性感染した病原体の排除を困難にするものと考えられる。

結核菌やBCGを実験的にマウスに接種した場合には、慢性感染が成立する。そこで、これらの菌に対する感染防御の成立へのPD-1の関与について解析した。BCGを正常およびPD-1欠損マウスに感染させ、経時的に抗原特異的T細胞によるサイトカイン産生と臓器内生菌数を測定した。その結果、BCG感染3週後の正常およびPD-1欠損マウスのCD4⁺T細胞は抗原刺激に対してどちらも強いIFN- γ およびTNF- α 産生を示したが、感染後6~12週目になると正常マウスのCD4⁺T細胞のサイトカイン産生能は、PD-1欠損マウスのCD4⁺T細胞に比べて明らかに低下していた。また、正常マウスよりもPD-1欠損

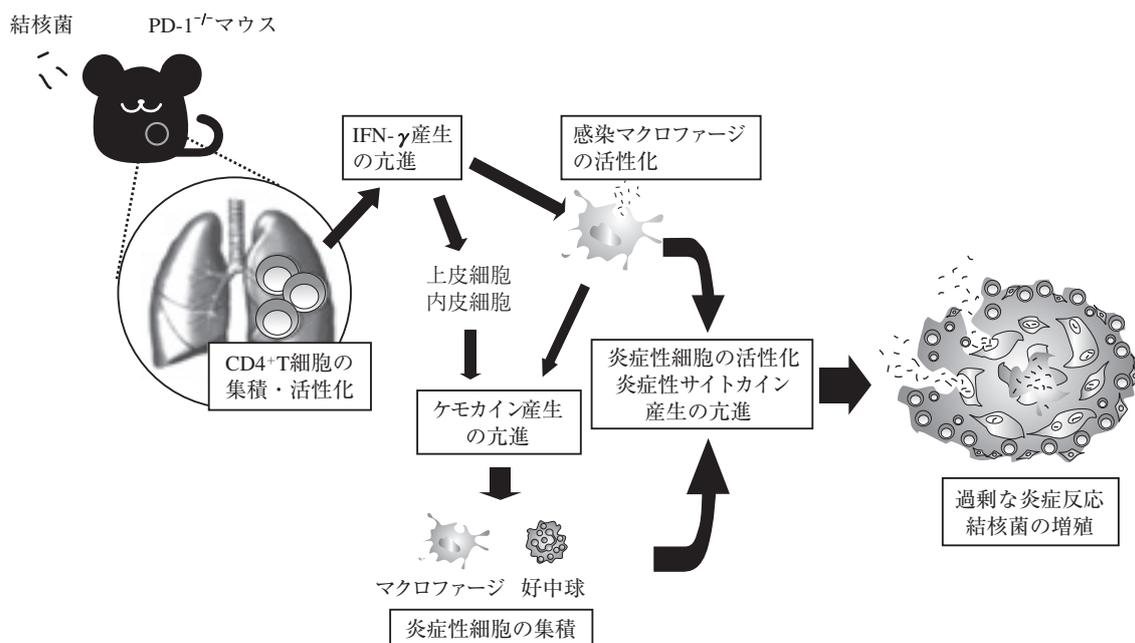


図2 結核菌に対する感染防御におけるPD-1の重要性

PD-1欠損マウスに結核菌を経鼻感染させると、感染3週目の肺にはTh1型T細胞が集積し、大量のIFN- γ を産生する。このIFN- γ 刺激を受けたマクロファージや上皮細胞、あるいは内皮細胞が大量のケモカインやサイトカインを産生する。その結果、感染局所では炎症性細胞の過剰な集積とそれら細胞の活性化が誘導される。このため、PD-1欠損マウスの肺では正常な感染防御応答が誘導されず、菌の増殖を許す結果になるのである。

マウスのほうが感染後期の菌の排除が亢進することがわかった。さらに、PD-1の特異的リガンドであるPD-L1の抗原提示細胞上の発現レベルがBCG感染3週目以降に増加したことから、BCG感染後期にはPD-L1の発現増強によりPD-1経路が活性化されるため、PD-1経路を介した抑制性シグナルがTh1型T細胞の機能を阻害し、感染防御応答が抑制されるものと考えられた。また、この結果から、PD-1シグナルを阻害することにより、BCGワクチンの効果を増強できる可能性が示された。

一方、結核菌に対する感染防御におけるPD-1の役割を調べたところ、正常マウスと比較してPD-1欠損マウスは結核菌感染に対して感受性であることが示された。肺内生菌数の経時変化について調べたところ、正常マウスの菌数は感染3週目までは増加したが、その後防御免疫の発現によって菌数は一定のレベルでコントロールされることがわかった。しかし、PD-1欠損マウスの肺では感染3週目以降も菌の増殖をコントロールすることができず、感染5週後にはPD-1マウスの肺内菌数は正常マウスの10,000倍に達した。組織学的解析を行ったところ、結核菌感染4週後のPD-1欠損マウスの肺では、多数の結節が観察され、その内部ではマクロファージや好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤と壊死を伴う領域が多数認められた。さらに、IFN- γ 産生の著明な亢進と、そ

れに伴う各種炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-17A) やケモカイン (MCP-1, MIP-1, CXCL1) 産生の増強が認められた。以上の結果から、結核感染後の急性期の肺ではPD-1を介したシグナルが過剰な炎症性反応を抑制して正常レベルの防御免疫を誘導するために重要な役割を果たしていることが明らかとなった (図2)。

まとめ

結核菌はヒトを宿主として共生することに最も成功した微生物の一つであり、ヒトへの感染の歴史は紀元前にも遡ることができる。この結核菌には宿主防御免疫に抵抗するための複雑な回避機構があり、そのメカニズムが次第に明らかになってきた。また、抗結核防御免疫は様々なT細胞によって形成された複雑なネットワークにより制御されており、それらT細胞の機能を適切にコントロールすることで、結核に対する感染防御能を高めることが可能になるものと考えられた。今後さらなる研究成果の蓄積が、結核菌の病原性の解明だけでなく、新たな予防ワクチンの開発に結びつくものと期待される。PD-1は、結核に対する感染防御に重要な役割を果たす分子であることが本研究から明らかとなった。PD-1を介した抑制性シグナルは肺での結核菌に対する初期感染防御の発現に重要で、秩序立った防御免疫反応を維持す

るために不可欠であることが示された。また、BCG感染実験では、PD-1を介したシグナル伝達がない場合に、BCGのワクチン効率が上がることが示された。これらの結果は、PD-1を介したシグナルを制御することが、ワクチンや新たな治療法の開発につながる可能性を示唆しており、今後この領域の研究から結核に対する感染防御に有益な情報を得ることができるものと期待される。

文 献

- 1) Vallejo AN, Nestel AR, Schirmer M, et al.: Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4⁺T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 : 8119–8129.
- 2) Turner J, Orme IM: Identification of altered integrin α/β chain expression on T cells from old mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Exp Gerontol.* 2002 ; 37 : 907–916.
- 3) van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM: Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2002 ; 15 : 294–309.
- 4) Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, et al.: Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: Evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 2001 ; 166 : 7477–7485.
- 5) Malik ZA, Menning GM, Kusner DJ: Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med.* 2000 ; 191 : 287–302.
- 6) Kohwiwattanagun J, Kawamura I, Fujimura T, et al.: Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. *Microbiol Immunol.* 2007 ; 51 : 253–261.
- 7) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 39798–39806.
- 8) Pethe K, Swenson DL, Alonso S, et al.: Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 ; 101 : 13642–13647.
- 9) Deretic V, Singh S, Master S, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* 2006 ; 8 : 719–727.
- 10) Vergne I, Chua J, Lee H-H, et al.: Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 ; 102 : 4033–4038.
- 11) Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 2811–2815.
- 12) Thompson CR, Iyer SS, Melrose N, et al.: Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2005 ; 174 : 3551–3561.
- 13) Master SS, Rampini SK, Davis AS, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host & Microbe.* 2008 ; 3 : 224–232.
- 14) Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al.: Protein kinase G from pathogenic Mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 2004 ; 304 : 1800–1804.
- 15) Scherr N, Honnappa S, Kunz G, et al.: Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 ; 104 : 12151–12156.
- 16) Brodin P, Poquet Y, Levillain F, et al.: High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. *PLoS Pathog.* 2010 ; 6 : e1001100.
- 17) MacGurn JA, Cox JS: A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun.* 2007 ; 75 : 2668–2678.
- 18) Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, et al.: Survival of Mycobacteria in macrophages is mediated by coronin-1-dependent activation of calcineurin. *Cell.* 2007 ; 130 : 37–50.
- 19) Simeone R, Bottai D, Brosch R: ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 2009 ; 12 : 4–10.
- 20) Van der Wel N, Hava D, Houben D, et al.: *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007 ; 129 : 1287–1298.
- 21) Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS: Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell.* 2012 ; 150 : 803–815.
- 22) Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al.: Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 ; 119 : 753–766.
- 23) Schmid D, Munz C: Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.* 2007 ; 27 : 11–21.
- 24) Deretic V: Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 ; 22 : 252–262.
- 25) Levine B, Mizushima N, Virgin HW: Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011 ; 469 : 323–335.
- 26) Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, et al.: Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 430–437.
- 27) Spira A, Carroll JD, Liu G, et al.: Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: A pivotal role for tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 ; 29 : 545–551.
- 28) Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, et al.: Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tu-*

- berculosis*. Nat Immunol. 2010 ; 11 : 751–758.
- 29) Wayne LG, Sohaskey CD: Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Microbiol. 2001 ; 55 : 139–163.
 - 30) Ottenhoff THM: New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. Trends Microbiol. 2012 ; 20 : 419–428.
 - 31) Lopez M, Sly LM, Luu Y, et al.: The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. J Immunol. 2003 ; 170 : 2409–2416.
 - 32) Xu Y, Jagannath C, Liu X-D, et al.: Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. Immunity. 2007 ; 27 : 135–144.
 - 33) Means TK, Wang S, Lien E, et al.: Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1999 ; 163 : 3920–3927.
 - 34) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al.: Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. J Exp Med. 2009 ; 206 : 2879–2888.
 - 35) Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al.: IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. Nature Immunol. 2007 ; 8 : 369–377.
 - 36) Lockhart E, Green AM, Flynn JL: IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol. 2006 ; 177 : 4662–4669.
 - 37) Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al.: IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. J Immunol. 2007 ; 178 : 3786–3796.
 - 38) Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. J Immunol. 2007 ; 179 : 2509–2519.
 - 39) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science. 1998 ; 282 : 121–125.
 - 40) Schaible UE, Kaufmann SHE: CD1 and CD1-restricted T cells in infections with intracellular bacteria. Trend Microbiol. 2000 ; 8 : 419–425.
 - 41) Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al.: IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. Nature Immunol. 2007 ; 8 : 369–377.
 - 42) Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al.: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992 ; 11 : 3887–3895.
 - 43) Okazaki T, Honjo T: PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. 2007 ; 19 : 813–824.
 - 44) Shimatani K, Nakashima Y, Hattori M, et al.: PD-1⁺ memory phenotype CD4⁺ T cells expressing C/EBP α underlie T cell immunodepression in senescence and leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 2009 ; 106 : 15807–15812.
 - 45) Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al.: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008 ; 26 : 677–704.
 - 46) Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al.: Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. J Immunol. 2002 ; 169 : 5538–5545.
 - 47) Okazaki T, Honjo T: The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. Trends Immunol. 2006 ; 27 : 195–201.
 - 48) Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al.: Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature. 2006 ; 439 : 682–687.
 - 49) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al.: PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature. 2006 ; 443 : 350–354.
 - 50) Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, et al.: Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. J Virol. 2007 ; 81 : 4215–4225.