

出タンパク質を SDS-PAGE で展開して、銀染色を行った。バンドを切り出し、ゲル内分解法を行った。ゲル中に含まれるタンパク質をトリプシン処理を行い、分解ペプチドを抽出した。断片ペプチドを nano-LC-MS/MS (ABI Q-STAR XL) によって検出した。得られた MS/MS スペクトルをデータベース検索 (Mascot 検索) することによってタンパク質同定を行った。

C. 研究結果

(1) 結核菌ファゴソームの生化学的分離

結核菌は BCG と違い、感染マクロファージ内で増殖することができる。これは ESX-1 によって分泌されるタンパク質がファゴソーム内での増殖に必須であることを示す。しかし、結核菌のファゴソーム内での増殖を支持する宿主因子はいまだ明らかになっていない。結核菌ファゴソームと融合する膜小胞の特徴を明らかにするため、生化学的に単離した結核菌ファゴソームのプロテオミクス解析によって、結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質を網羅的に同定した。*M. tuberculosis* Erdman を Raw264.7 マクロファージに感染させて、ファゴソーム画分をショ糖密度勾配遠心分離法によって単離した。単離したファゴソーム画分に含まれる細胞内小器官を観察するため、ファゴソーム画分の切片を透過型電子顕微鏡法で観察した。結核菌ファゴソーム画分には、結核菌ファゴソームと付着する膜小胞以外の細胞内小器官は見つからなかった。このことは、結核菌ファゴソーム画分には他の細胞内小器官の混入はないことを示す。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームの形態比較を行った。ラテックスファゴソーム内膜には電子線を透過しない物質や小胞が存在していたが、結核菌ファゴソーム内膜は透過性であった。以上の結果は、結核菌ファゴソームにおいてファゴリソーム形成が阻害されていることを示す。

(2) 結核菌ファゴソーム画分の二次元電気泳動

結核菌ファゴソーム画分とラテックスビー

ズファゴソームに含まれるタンパク質を二次元電気泳動法によって展開した。結核菌ファゴソーム画分において、銀染色によって 200 以上のスポットが観察された。ラテックスビーズファゴソーム画分において顕著なスポットは、これまでの報告と同様に、カテプシンなどの加水分解酵素、CyCap などのリソソーム特異的タンパク質であった。結核菌ファゴソーム画分においては、リソソーム特異的なタンパク質スポットは見つからず、calreticulin、Grp78、PDI など小胞体特異的タンパク質が顕著なスポットであった。このことは結核菌ファゴソームと小胞体由来膜小胞の融合、もしくは小胞体と直接融合することを示唆する。

(3) 結核菌ファゴソーム画分に含まれるタンパク質の網羅的同定

結核菌ファゴソーム画分抽出タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS 法によって行った。SDS-PAGE で結核菌ファゴソーム画分を展開して、銀染色を行った。切り出したバンドからトリプシン処理後、断片ペプチドを抽出した。抽出したペプチドを nano-LC-MS/MS によって質量解析を行った。結核菌ファゴソーム画分には後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 や v-ATPase のサブユニットタンパク質、リソソームマーカータンパク質である LAMP-1 や LAMP-2 などが含まれていた。また、ミトコンドリア特異的シャペロンの CH60 も含まれていた。さらに、小胞体タンパク質である Grp78、PDI、リボソームサブユニットタンパク質も同定した。

(4) 結核菌ファゴソームと BCG ファゴソームに含まれるタンパク質の比較

結核菌ファゴソーム画分と BCG ファゴソーム画分に含まれるタンパク質の比較を行った。結核菌はマクロファージ内で増殖できるが、BCG は増殖できないことが示されている、感染 24 時間後のファゴソーム画分を単離して、抽出タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS 法によって行った。結核菌ファゴソーム画分には 1168 タンパク質、BCG ファゴソームには 881 タンパク質含まれていた。共通して含まれていたタンパク質は 675

タンパク質含まれていた。次に、結核菌ファゴソーム画分とラテックスビーズファゴソーム画分に含まれているタンパク質を比較した。結核菌ファゴソーム画分には細胞質、ミトコンドリア由来タンパク質が多く含まれていた。ラテックスビーズファゴソーム画分にはエンドソーム、リソソーム、小胞体由来タンパク質が結核菌ファゴソーム画分に比べて多くを占めていた。しかし、結核菌ファゴソーム画分だけにしか含まれていないタンパク質は 104 タンパク質存在していたが、29 のタンパク質が小胞体由来タンパク質であった。結核菌ファゴソーム特異的タンパク質で最もスコアが高かったタンパク質は Erlin-2 であった。Erlin-2 はリピッドラフトに局在する GPI アンカータンパク質である。Erlin-2 の結核菌増殖における機能を明らかにするため、Erlin-2 を siRNA 法でノックダウンしたマクロファージに結核菌を感染させた。Erlin-2 ノックダウンマクロファージにおいて感染後 1、2 日後における結核菌の増殖はコントロールマクロファージに比べて阻害されていた。以上の結果は、Erlin-2 は感染初期における結核菌のマクロファージ内における増殖を支持することを示す。

D. 考察

これまで結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質の解析は、特定のリソソームタンパク質の結核菌ファゴソームにおける局在を明らかにすることにとどまってきた。また、結核菌ファゴソームのマーカータンパク質である Coronin-1 (TACO) は生化学的に単離した結核菌ファゴソームに特異的に含まれるタンパク質として同定された (Cell. 1999 May 14;97(4): 435-47)。しかし、Coronin-1 は一般的ファゴソームにおいても局在するタンパク質として明らかになっている (J Cell Biol. 2001 Jan 8;152(1): 165-80)。本研究において、結核菌ファゴソームに Rab7 や v-ATPase などの後期エンドソームタンパク質、LAMP-1 や LAMP-2 などのリソソームタンパク質が局在することが明らかになった。また、数多く

の小胞体タンパク質が結核菌ファゴソームに局在することも明らかになった。以上の結果は、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソソーム形成が阻害されることを示唆する。また、本実験結果は、結核菌の感染初期における増殖は Erlin-2 を含む小胞と結核菌ファゴソームの融合によって支持されていることを示唆する。

E. 結論

結核菌ファゴソームのプロテオーム解析の結果は、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソソーム形成が阻害されることを示唆する。さらに結核菌の感染初期におけるマクロファージ内での増殖には Erlin-2 を含む小胞との融合が必要であることを示唆する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eweda, G., D. Suzuki, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine, 28: 4616-4625.
- 2) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. Microbiol. Immunol., 54: 170-174.
- 3) Wang, L.-X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, and Y. Koide. 2010. Identification of

HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secretory protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine*, 28: 2026-2031.

- 4) Suzuki, D., T. Nagata, G. Eweda, S. Matsumoto, M. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2010. Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine*, 28: 2020-2025.
- 5) Uto, T., K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto, T. Nagata, T. Suda, K. Chida, H. Nakamura, and Y. Koide. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Koide, Y., S. Seto, and K. Tsujimura. Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 2) 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 小出幸夫. イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームの分子解剖. 第85回結核病学会総会 2010年5月 京都
- 3) Yamamura, Y., S. Seto, M. Uchijima, H. Hodumi, T. Nagata, K. Tsujimura, and Y. Koide. Immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 第83回日本細菌学会 2010年3月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析

分担研究報告書

研究分担者

長谷 篤

(大阪市立環境科学研究所・課長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析

研究分担者 長谷 篤 （大阪市立環境科学研究所・微生物保健担当・課長）
研究協力者 和田 崇之 （大阪市立環境科学研究所・微生物保健担当・研究主任）

研究要旨.

日本国内の結核患者から分離される結核菌臨床株は、約8割が「北京型」と呼ばれる単一の系統群に属している。本邦の北京型結核菌は、さらに5種類の亜系統に細分されることが知られているが、その菌株特性については明らかでない。系統分岐の過程で突然変異によって生じる遺伝的特性は各系統群の疫学的特性を規定すると同時に、応用的には系統分類マーカーとして活用可能である。各亜系統群から代表株を選び、それらの比較ゲノムによって見出された各固有の突然変異（SNPs）の有無を他の臨床分離株について分析した。その結果、各亜系統群ともに様々なSNPs共有パターンが見出され、結核菌が各群の中で分岐を繰り返しながら現在の集団構造を形成してきたことが見出された。共有SNPsが少なかった亜系統群では、代表株が初期の段階で系統分岐したことにより、群全体から乖離した株であった可能性があるため、再度代表株を選びなおし、ゲノム情報を再検証する必要があると考えられた。韓国において高頻度で見出される亜系統群（G2群）は、今回解析対象としたSNPsによって特異的な分岐が見出されず、本邦由来株との遺伝的分類は困難であると考えられた。今後、次世代シーケンサーなどの活用によって様々な菌株のゲノム情報を蓄積することにより、より詳細かつ正確な株の由来推定や進化学的考察が可能となるだろう。

A. 研究目的

結核患者から分離される結核菌株の遺伝的多様性とそれに起因する菌株の個性、すなわち異なる菌株における病原性や伝播力、免疫原性といった性質の違いは、結核菌の研究対象として新たな展開を繰り返している。とりわけ、わずか数年の間に劇的な技術的進歩とコストパフォーマンスの向上を見せた次世代シーケンサーによるゲノムシーケンシングは、微生物の全ゲノム塩基配列を容易に同定しうるツールとして活用可能であり、「菌株」をターゲットとした研究展開に拍車をかけている。

日本国内の結核菌では、東アジア地域で優先的に分離される「北京型」と呼ばれる系統群に属する菌株が多数検出されることが知られている（全体の約8割）。国内の北京型結核菌は、詳細な遺伝系統分類によっ

てさらに5つの亜系統群（系統発生順にG2, G3, G4, G6, G7-9）に細分類可能である。

これらの亜系統群はそれぞれ遺伝的に単系統で、分子進化学的には段階的に分岐しながら国内で定着してきたことが推定される。そのため、各亜系統群にはそれぞれ固有の遺伝的個性（固有変異）が存在し、伝搬性や薬剤耐性の獲得能などに影響を与えていると考えられている。このような固有変異は、各亜系統群の菌株個性を規定する遺伝的要因を含んでいると同時に、臨床分離株を系統分類するための遺伝マーカーとして分子疫学的に有用である。ゲノム個性の詳細解析はその糸口を掴む重要なアプローチであり、大規模ゲノム解析はキーテクノロジーとして着目されるものである。

一方で、中国、韓国をはじめとした近隣の東アジア諸国では、日本と同様に北京型

結核菌が大勢を占めるものの、その詳細な亜系統群構成は大きく異なっている。中国（特に都市部）では遺伝的多様性が低い G7-9 群が高度に優先しており、比較的新しい伝播が原因となって集中的に定着したと考えられる。対照的に、韓国では G2 群が最も優先しており、G7-9 群がそれに続くことがわかってきた (Kang, et al., J. Med. Microbiol. 59, 1191-7, 2010)。このような地理特異的な集団構造は、結核菌株がある程度の閉鎖性を持って各国各地域内で循環していることを示唆している。そのため、各地域由来の菌株には遺伝的個性が存在すると予想され、結核菌の伝播経路を科学的に裏付ける結核分子疫学の遺伝マーカーとして国際的なレベルで活用可能になると考えている。

これまでに我々は、本邦の北京型結核菌における遺伝的多様性およびゲノム特性を解析するため、代表株（各 1 株、計 5 株）を選んで比較ゲノムハイブリダイゼーション法 (CGH 法, comparative genomic hybridization) による変異マッピングを行ってきた。北京型に共通する遺伝的個性の他、各株ともに約 200 箇所の変異 (SNPs) および 2~10 箇所の変異欠損 (RDs) が既に同定されている。これらの固有変異には、1) 各亜系統群に共通した変異と 2) 解析代表菌株の固有変異が含まれていると考えられる。本解析によって得られた変異マッピング情報は一義的には代表株固有のものであるが、別の菌株集団で変異頻度を分析することにより、遺伝マーカーとしての客観性と応用性、株個性に関わる変異の抽出、さらなるゲノム解析株の検討に役立てられる。

本研究課題では、CGH 解析によって見出された SNPs のうち、非遺伝子領域に検出された SNPs に着目する。このような変異は菌株の表現型に影響しないと考えられ、各亜系統群における遺伝的多様性を推定する上で有用な指標となりうる。一定数の臨床分離株について SNPs の有無を分析し、1) 各亜系統群が全体としてどのように細分岐しているのかを推定し、2) CGH 解析対象株の

ゲノム比較データが各亜系統群全体の遺伝的多様性を評価する上で妥当であったか否かについて検討を行った。また、韓国において分離された北京型結核菌 (G2 群) についても、同様の SNPs 解析によってどのように分類されるのかを精査し、遺伝的な地理的特異性を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

CGH 解析によって非遺伝子領域に検出された SNPs は、各亜系統群代表株 (5 株) において以下の通りである; G2 株 (22 箇所), G3 株 (29 箇所), G4 株 (23 箇所), G6 株 (22 箇所), G7-9 株 (27 箇所)。これらの変異の有無について、報告済みの母集団 (Iwamoto et al., J. Clin. Microbiol. 47, 3340-3, 2009) から無作為に抽出された菌株 (G2 群: 8 株, G3 群, G4 群, G6 群: 24 株, G7-9 群: 16 株) を用いて検証した。変異の有無はそれぞれの変異箇所を挟んで約 300 bp を増幅できるように PCR プライマーをデザインし、各菌株から増幅産物を得てサンガー法によるダイレクトシーケンシングにより確認した。

韓国由来株についても韓国全域から集められた菌株母集団 (Kang, et al., J. Med. Microbiol. 59, 1191-7, 2010) から G2 群に属する北京型結核菌株 (29 株) を抽出し、上記と同様の方法により変異の有無を確認した。

倫理面への配慮

本研究に用いた国内外の結核菌株は、個人情報の特定が不可能となるように番号をつけ匿名化した。国内の結核菌株の分析は、本邦における未知の結核感染源および伝播経路推定に重要な情報を与えうることから、感染症法 15 条および 17 条により規定される「積極的疫学調査」に適合するものである。

C. 研究結果

本研究課題では、ゲノム比較から見出された北京型亜系統群の結核菌における固有変異情報を基にして、1) 本邦由来北京型結核菌株の遺伝的多様性分析、および 2) 韓

国由来北京型結核菌 G2 株の遺伝的特性分析を行っている。以下、それぞれの研究結果について記述する。

1) 本邦由来北京型結核菌株の遺伝的多様性分析

a. G2 群

G2 群は、わが国において多剤耐性結核菌の分離頻度が分子疫学的に高いことが報告されている (Iwamoto et al., *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52, 3805-9, 2008)。また、韓国での出現頻度が高いことから、渡航者などに起因する同国との結核菌伝播解析の標的として重要である。

CGH 解析で認められた SNPs (22 箇所)のうち、20 箇所が G2 群固有 SNPs であった。分析した 8 株のうち、3 株 (37.5%) が 19 箇所の SNPs を共有しており、CGH 解析対象株とのクローン性がきわめて高いと考えられた。残る 5 株からは 3 種類の共有 SNP パターンが確認された。

b. G3 群

G3 群は、老人性結核患者から分離される頻度が高い (Iwamoto et al., *J. Clin. Microbiol.* 47, 3340-3, 2009)。VNTR 型別によると各菌株間の遺伝的同一性が低く、日本以外での分離例が無いことから、本邦固有の定着群であると考えられている。

CGH 解析で認められた SNPs (29 箇所)のうち、2 箇所 PCR 増幅不良、25 箇所が G3 群固有 SNPs であった。分析した 24 株のうち、多くの株 (21 株, 87.5%) で 9 箇所のみ SNPs を共有していた。残る 3 株も 8~10 箇所の SNPs 共有を認めるのみであり、CGH 解析対象株が集団全体から逸脱した系統分岐株であった可能性が残された。

c. G4 群

G4 群は、現時点で明瞭な疫学的特性は見出されていない。日本以外での分離例が稀であることから、本邦固有の定着群であると考えられている。

CGH 解析で認められた SNPs (23 箇所)は、全て G4 群固有 SNPs であった。分析した 24 株は 1 株を除いて 15~17 箇所の共通 SNPs を有していたことから、G3 群の代表株と同じく、CGH 解析対象株が集団全体から逸脱

した系統分岐株であった可能性がある。しかし、全株ともに共有 SNPs の数が比較的多いことから、G4 群は他の亜系統群と比較して、遺伝的多様性が低いと考えられる。

d. G6 群

G6 群は、現時点で疫学的特性は見出されていない。VNTR 型別からはさらに 2 種類のグループに細分類され、それぞれが独立的に国内で伝播、定着していると考えられている。他の亜系統群よりも分離頻度が高く、結核菌として現在本邦で最も拡散している菌株群である。

CGH 解析で認められた SNPs (22 箇所)のうち、19 箇所が G6 群固有 SNPs であった。VNTR 型別での分類と合致して、共通の SNPs が 2~4 箇所のみ菌株 (18 株, 66.7%) と 11~12 箇所の SNPs を共有する菌株 (6 株, 33.3%) に大別された。前者は CGH 対象株と同一性が低く、後者は各菌株間において VNTR 型別の変化が微小であることから、比較的近年に伝播・拡散した菌株群であることが伺える。

e. G7-9 群

G7-9 群は「蔓延型 (modern 型)」と呼ばれる亜系統群であり、日本を除く世界各地での伝播/定着が報告されている。本邦でも患者間の伝搬力が強いことが示唆されており (Wada et al., *tuberculosis.* 89, 252-5, 2009)、公衆衛生上重要性が高いと考えられている。

CGH 解析で認められた SNPs (27 箇所)のうち、26 箇所が G7-9 群固有 SNPs であった。分析した 16 株のうち、1 株は 25 箇所の SNPs を共有しており、CGH 解析株とクローン性が高いことが示唆された。残る 15 株は共通 SNPs が 12 箇所 (3 株), 13 箇所 (4 株), 14 箇所 (8 株) と、短期間の進化時間で集中的に系統分岐が生じていた。

2) 韓国由来北京型結核菌 G2 株の遺伝的特性分析

韓国において優勢である G2 群結核菌について、1)-a. で示した G2 群固有 SNPs 解析を韓国の由来株 (29 株) を用いて行った。現在、20 箇所の固有 SNPs のうち 5 箇所の

み解析終了している段階であるが、系統的に2群に大別され、一方はCGH解析株と高いクローン性を示し(15株)、もう一方は逆に低い相同性を示した(14株)。

D. 考察

本研究結果により、本邦の北京型結核菌における亜系統群は、CGH解析によって見出された固有SNPsに基づいて細分可能であることが判明し、国内結核菌における遺伝的多様性の全貌が明らかになりつつある。本研究に用いられたSNPs情報は、それぞれ結核菌株の遺伝系統マーカーとして使用可能であり、本邦において伝播・定着してきた結核菌の分子進化学的マーカーとして今後の研究に用いることができる。これらはVNTR型別では充分でなかった「菌株の遺伝的相同性を客観的に評価しうる遺伝マーカー」であり、より精度の高い菌株同定に基づいた正確な伝播経路の再構築に役立つものである。

しかしながら、G3群における分析では、CGH解析株で見出された多数のSNPsが他の菌株において検出されないという結果となった。CGH解析株が当該の亜系統群の中で初期の段階で分岐した可能性がある。このような場合、CGH解析株が必ずしも亜系統群の代表として適切でなかったと考えられ、異なる株の選定とそのゲノム比較解析を改めて行う必要がある。あるいは、G3群の菌株は互いに遺伝的相同性が低く、どのような株を解析してもこのような結果になる可能性も残されており、注意深く検討を続ける必要がある。

G6群ではVNTR型別解析から予想されたように、さらに詳細な2群の存在が示唆されている。また、G7-9群では特徴的な分岐のホットスポットが存在しており、それらの分岐先をそれぞれゲノム比較対象株として追加していくことで、本邦における結核菌多様性包囲網としてのゲノム情報が補完されると考えられる。

韓国由来株のうち、主要なG2群株については、CGH解析株と相同性が高い菌株の存在が示唆されている。この事実は、本邦と

韓国において、結核菌株の由来をゲノム情報から同定することが困難であることを意味している。渡航者などに起因する国際的伝播を東アジア地域で実現するためには、より詳細なSNPs解析と韓国由来株のゲノム比較解析を行う必要があるだろう。

本研究に用いられたCGH解析に基づく変異同定は、次世代シーケンサーによるゲノム解析と比較して精度が低く、今後の解析ではIllumina社のGenome Analyzerを活用した配列解読ならびにゲノム比較を検討している。本研究結果によって浮かび上がってきた結核菌株の遺伝的多様性は「国内結核菌における遺伝学的俯瞰図」であり、より効率のよい解析対象株の選定を可能とする。網羅性の高い変異マッピング情報を完成させ、結核菌分子疫学からゲノム疫学へのパラダイムシフトを促す端緒としたい。

E. 結論

本邦において定着している結核菌株は北京型に属する5種の亜系統群であり、それらの各代表株におけるゲノム比較から得られたSNPs情報に基づいて、各亜系統群内における系統分岐と全体的な遺伝的多様性を分析した。その結果、各亜系統は複数の微細系統を内包し、各系統分岐を支持するSNPsは今後それらの遺伝マーカーとして活用可能であると考えられた。韓国内での定着が示唆されるG2群株との比較では、本邦のG2株と相同性が高く、ゲノム比較でさえ由来を推定できない菌株が存在することが示唆されている。今後ゲノム比較対象株を拡張することにより、さらに詳細な遺伝的多様性が明らかになるとともに、より有益な遺伝マーカーが確立できるだろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 和田崇之, 岩本朋忠, 吉田志緒美, 長谷篤, 前田伸司. マイクロアレイCGH法による本邦由来北京型結核菌のゲノ

△個性解析. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都.

- 2) 和田崇之, 團野桂, 松本智成, 田丸亜貴, 門林順子, 松本健二, 岩本朋忠, 吉田志緒美, 前田伸司, 長谷篤. 多発性大規模感染株による多剤耐性化事例について. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都.
- 3) 和田崇之, 三宅由起, 加藤仁一, 吉田英樹, 岩本朋忠, 田丸亜貴, 松本智成, 吉田志緒美, 前田伸司, 下内昭, 長谷篤. 多発性大規模感染に関連する結核菌株による集団事例の疫学情報. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都.
- 4) Wada, T., T. Iwamoto, S. Yoshida, A.

Hase, and S. Maeda. Comprehensive analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Japan: the evolution, epidemiological characteristics, and genomic comparison. MEEGID X: 10th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, 3-5 November, 2010, Amsterdam, the Netherlands.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究

分担研究報告書

研究分担者

慶長 直人

(国立国際医療研究センター研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究

研究分担者 慶長直人 （国立国際医療センター研究所・呼吸器疾患研究部・部長）
研究協力者 土方美奈子 （国立国際医療センター研究所・呼吸器疾患研究部・室長）

研究要旨.

抗酸菌症発症とその病態には、宿主の免疫状態が重要な影響を与えている。多剤耐性結核患者の治療中の免疫病態と血液中の免疫関連遺伝子発現との関連を明らかにするため、国際共同研究の中で、ベトナム人多剤耐性結核患者 50 名の血液提供試料 7.5 ml、すなわち、治療開始 3 から 6 か月後の、採取直後の全血および、結核菌特異抗原で 6 時間刺激した培養全血中の Th1 関連遺伝子の発現プロファイルを定量的 RT-PCR により測定した。Th1 免疫関連遺伝子の非刺激時と刺激時の遺伝子発現プロファイルには特徴があり、非刺激状態では、IFNG、と IFNGR1、IL12A と IL12RB1 とが、それぞれ比較的強い正の相関 ($r = 0.46$ 、 $r = 0.43$) を示した。結核菌特異抗原による刺激後の全血中では、IFNG および CXCL10 が著しく誘導され ($P < 0.001$)、その二者の相関は $r = 0.90$ と高かった。明らかにこれらの遺伝子の誘導が抑えられている症例も認められた。さらに関連する遺伝子発現のプロファイルを解析することにより、治療経過中の免疫状態と治療応答との関連についてさらに検討を加えたい。

A. 研究目的

結核は、現在も世界人口の 3 分の 1 が感染し、近年、開発途上国を中心に、近年、多剤耐性結核と HIV 合併結核が新たな問題となっている。わが国でも、感染症のグローバル化は著しく、結核の分野では、特に、海外からの結核感染者、発症者の流入が、将来的に深刻な問題となる可能性がある。欧米の先進国では、すでに、移民の結核が結核対策の主な対象となっている。このような情勢を踏まえて、国際的な共同研究を行うことは有益と思われる。

抗酸菌症発症とその病態には、宿主の免疫状態が重要な影響を与えている。家族性の重篤な抗酸菌感染症の原因遺伝子解析結果から、インターフェロン γ -インターロイキン 12 を軸とする Th1 系免疫応答は、ヒトにおいても、結核免疫病態の重要な部分を構成していると考えられる。

多剤耐性結核は、特に結核治療の根幹をなすふたつの薬剤、イソニアジドとリファ

ンピシンに耐性な結核菌と定義され、治療は困難で長期化する傾向にあるため、薬剤開始後、よりの確に病勢や治療反応性を評価する指標を開発することが望まれる。近年、動物モデルなどを用いた基礎免疫研究で近年得られた細胞性免疫に関わる免疫関連遺伝子の発現に関心が持たれ、Th1 系サイトカインやインターフェロン誘導ケモカインなどいくつかの免疫指標が、治療効果を観測する目的で研究、報告されているが、その意義は十分確立していない。治療により、連続した菌の陰性化が見られる以前に、免疫力の回復傾向を早期に反映する治療関連指標の確立が望まれる。

今回、ベトナムとの国際共同研究の中で、多剤耐性結核の治療反応性と血液中の免疫関連遺伝子発現プロファイルとの関連を明らかにするための予備的研究を実施したので報告する。

B. 研究方法

ベトナムホーチミン市において、共同研究機関であるファム・ゴック・タック病院の多剤耐性結核外来通院中の患者 60 名について、全例、治療開始後 3 から 6 か月後の時期に、全量 7.5 ml の採血を実施した。

研究参加者選定基準は、治療開始時に、喀痰塗抹陽性活動性の多剤耐性肺結核患者で、16 歳以上 70 歳以下（ベトナムにおける成人の基準にもとづく）、治療開始後 3 か月から 6 か月に採血可能、その後、継続して、3 か月間隔で 4 回（計 5 回）の連続した喀痰検査を実施し、18 か月後の効果判定が可能なこととした。除外基準は、HIV 合併、悪性腫瘍の合併、免疫抑制療法中の者とした。

背景因子として、年齢性別、基礎疾患、疫学、診断、治療関連情報を得た。

今回はパイロットスタディのため、検定に基づく正確なサンプルサイズの推定は困難で、ほぼ半年でエントリーが終了できる症例数として、60 例を目標として、設定した。

倫理面への配慮

研究計画はベトナム ファム・ゴック・タック病院とわが国の国立国際医療センターの倫理審査委員会にて承認された。今回報告する研究部分は、遺伝子発現を見る研究であり、ヒトゲノムを扱う研究ではないが、他の研究部分に、遺伝子多型解析が含まれるため、日本における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）と、ベトナムにおける「生物医学研究に関する倫理審査委員会の組織と運営に関する規則」を遵守した。

試料提供者については、検体提供施設で、説明文書を用い、試料提供者に説明し、同意書に署名を求め、インフォームドコンセントを得た。試料提供者の個人情報に関しては、試料提供施設の特定の医師が把握して、匿名化され、記号で送られることとした。具体的には各血液試料に記号のついたラベルを貼付し、個人を識別する情報は移送しなかった。個人情報と記号を対応させ

たファイルはファム・ゴック・タック病院の鍵のかかる部屋に保管され、遺伝子解析結果を取り扱わない、同病院の企画部イエン医師が個人情報管理者となった。

血液 7.5 ml のうち、1ml は通常の臨床検査情報に利用された。血液 2.5 ml は直接市販の PAXgene Blood RNA tube (PreAnalytiX) に採取して、攪拌、室温 2 時間後、凍結した（検体 C）。血液 2 ml × 2 は、QuantiFERON Gold-in tube (Cellestis) Nil, TBAg 用の各チューブに分注して、攪拌、37 度 6 時間インキュベーション後、それぞれ全血を PAXgene Blood RNA tube に採取して、攪拌、室温 2 時間後、凍結した（検体 N、検体 T）。PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) を用いて、total RNA を回収した。SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて、60 例のうち、検体 C, N, T とともに RNA 濃度の十分に得られた 50 例に RT 反応を行った。

基準となる cDNA を外部標準にして、 $\Delta\Delta Ct$ 法で相対的発現量の計算を行い、また GAPDH を内部標準として補正した。

C. 研究結果

1) 対象集団の背景因子

性別は男性 35 名、女性 15 名、年齢は中央値 39 歳（IQR 27.5-48.3 歳）

2) 新鮮全血の遺伝子発現量に関する多変量の相関

IFNG, CXCL10, IFNGR1, IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, IL12A について、相対的発現量の相関を検討した。相関係数は非刺激状態（検体 C）では、IFNG、と IFNGR1、IL12A と IL12RB1 とが、それぞれ比較的強い正の相関（ $r = 0.46$ 、 $r = 0.43$ ）を示した。

3) 結核特異抗原により刺激誘導される遺伝子群

結核菌特異抗原 (CFP10, ESAT6, TB7.7 の合成ペプチド) による刺激後の全血中では、IFNG および CXCL10 が著しく誘導され（ $P < 0.001$ ）、その二者の相関は $r = 0.90$ と高かった。症例によっては、明らかにこれらの遺伝子の誘導が抑えられているケースが認められた。

表 1

多剤耐性結核患者新鮮全血の遺伝子発現プロファイル (相関行列 r)

	CXCL10	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IL12RB1	IL12RB2	IL12A
CXCL10	1.0000	0.5231	0.0982	-0.2638	0.1076	-0.0145	0.2122
IFNG	0.5231	1.0000	0.4640	-0.0333	0.2136	0.0734	0.2784
IFNGR1	0.0982	0.4640	1.0000	0.2897	0.0604	-0.1040	-0.0501
IFNGR2	-0.2638	-0.0333	0.2897	1.0000	-0.0144	-0.1748	-0.1204
IL12RB1	0.1076	0.2136	0.0604	-0.0144	1.0000	0.5251	0.4286
IL12RB2	-0.0145	0.0734	-0.1040	-0.1748	0.5251	1.0000	0.3342
IL12A	0.2122	0.2784	-0.0501	-0.1204	0.4286	0.3342	1.0000

表 2

多剤耐性結核患者結核菌特異抗原刺激後の遺伝子発現プロファイル (相関行列 r)

	CXCL10	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IL12RB1	IL12RB2	IL12A
CXCL10	1.0000	0.9042	0.0438	0.2727	0.1009	0.3844	0.4723
IFNG	0.9042	1.0000	0.0230	0.1197	0.1198	0.3161	0.4869
IFNGR1	0.0438	0.0230	1.0000	0.3880	0.5133	0.1491	0.2592
IFNGR2	0.2727	0.1197	0.3880	1.0000	0.1670	0.1285	0.0590
IL12RB1	0.1009	0.1198	0.5133	0.1670	1.0000	0.5059	0.3753
IL12RB2	0.3844	0.3161	0.1491	0.1285	0.5059	1.0000	0.4478
IL12A	0.4723	0.4869	0.2592	0.0590	0.3753	0.4478	1.0000

D. 考察

本研究では、多剤耐性結核患者の治療 3 から 6 か月後の新鮮血より抽出した RNA および、結核菌特異抗原による刺激の有無による RNA を用いて、全血末梢血細胞の Th1 関連遺伝子の発現プロファイルを検討した。

結核症におけるヒトの Th1 応答の意義については、マウスの系に比べて、研究用試料が入手し難いことから、必ずしも十分に検討が進められていない。特に末梢血を用いた検討では、血漿中のサイトカイン濃度に関する検討が散見されるが、末梢血細胞の遺伝子発現プロファイルについて、耐性結核の治療に関する広範な検討はなされていない。

近年、全血の解析に有用な RNA 安定化剤が開発され、採血現場で、密度勾配による白血球の分離などの煩雑な作業を行わずとも、RNA を安定した状態で、全血のまま

凍結移送し、後日、設備の整った研究室で、抽出し、逆転写反応および定量的 PCR を実施することが可能になった。

本検討は予備研究としての色彩が強く、治療開始後、3 か月から 6 か月目の初期治療の効果判定時に、一回の採血のみ実施した。今後、免疫関連遺伝子プロファイルを明らかにすることにより、将来、治療経過に伴う遺伝子発現変化を縦断的に観察する研究の基礎データに供したい。

その結果、予期されたように、未刺激状態の全血における、IFNG の発現と IFNGR1 の発現の相関、IL12A と IL12RB1 の発現の相関のように、多剤耐性結核患者の末梢血中の Th1 系遺伝子発現量の個体差は、インターフェロニン γ 関連遺伝子群とインターロイキン 12 関連遺伝子群のように、Th1 関連遺伝子間では相互に関連を示し、発現量の強弱がセットで観察された。

一方、結核菌特異抗原による刺激培養後、

IFNG および CXCL10 の著しい発現亢進が観察された。しかしながら、今回検討したそれ以外の Th1 系遺伝子では、刺激後 6 時間という時間経過では、強い発現誘導は見られなかった。

データには示していないが、結核菌特異抗原で刺激しても、IFNG および CXCL10 の著しい発現誘導がかからない症例が複数存在し、このような現象がどのようなメカニズムで生じているのか、今後、Th2 系、Treg 系など、周辺の免疫関連遺伝子の発現解析を追加し、さらにこの誘導抑制が、临床上、治療応答とどのように関連しているのかをさらに検討して行きたい。

E. 結論

結核発症と病態に関わる宿主側因子を明らかにする上で、多剤耐性結核という疲弊し、深刻な状況における、治療時（初期から中期）の、末梢血中の Th1 系遺伝子群の発現プロファイルを観察した。すなわち、RNA 安定化処理後、凍結保存全血から、定量的 RTPCR の系で、非刺激時と結核菌特異抗原刺激培養時の遺伝子発現量の定量解析を実施し、予備的な知見を得た。

臨床疫学情報をさらに収集し、遺伝子数を増やすことで、結核免疫の軸となる遺伝子発現状態と治療との関連に関する検討を進めたい。

謝辞

本研究は、当研究部の櫻田紳策室長、松下育美研究員、ファム・ゴック・タック病院グエン・ファイ・ズン院長を初めとする呼

吸器科医、臨床検査部との共同研究である。また若林佳子研究補助員の卓越した技術に感謝したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuyama, M., Y. Miura, T. Kiwamoto, A. Moriya, N. Kokuho, K. Shimizu, S. Otsuka, M. Hijikata, N. Keicho, K. Hayashihara, and T. Saito. 2010. A case of familial pulmonary Mycobacterium avium complex disease. *Internal. Med.*, 49: 949-953.
- 2) Ridruechai, C., S. Mahasirimongkol, J. Promjai, H. Yanai, N. Nishida, I. Matsushita, J. Ohashi, N. Yamada, S. Moolphate, C. Chuchotaworn, W. Manosuthi, P. Kantipong, P. Sawanpanyalert, N. Keicho, S. Khusmith, and K. Tokunaga. 2010. Association analysis of candidate regions on chromosome 5q31 for tuberculosis. *Genes Immun.* 11: 416-422.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

向井 徹

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌感染症の予防・診断法に関する研究

研究分担者 向井 徹 （国立感染症研究所・感染制御部・室長）
研究協力者 前田百美 （国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官）

研究要旨.

安定した蛋白発現抗酸菌構築のため、これまでに抗酸菌ファージゲノムより、強力なプロモーター活性を示す領域を同定してきた。本領域を用い、integrase による組込み型 GFP 発現 BCG の安定性を検討した。その結果、4 週の液体培地培養により、GFP 脱落菌の出現をみた。この脱落は、integrase 遺伝子のゲノムへの共組込みが一つの原因と考え、integrase 酵素を trans に供給する系を構築し、*M. smegamatis* において機能することを示した。これらの結果は、蛍光蛋白を発現する *M. leprae* 構築に有用なものと考えられた。

A. 研究目的

安定した蛋白発現抗酸菌構築のため、強力なプロモーター領域を抗酸菌ファージゲノムより同定してきた。同定された領域は、integrate 型であっても、これまでの extrachromosome 型蛋白発現と比較し十分な蛋白を抗酸菌に産生させることを示してきた。

integrate 型遺伝子発現組換え抗酸菌の作製には、homologous recombination による方法、integrase, recombinase などの酵素による方法が知られている。homologous recombination は、古典的な手法であり、非常に効率が悪いことから、現在 integrase, recombinase など組換えを起こす酵素を利用した手法の開発が進められている。integrase は、非常に短い領域を介し、組み込み効率よく組換え抗酸菌が得られるが、integrase も同時にゲノムへ組込まれる(図 1-A)。recombinase を用いた場合は、任意のゲノム領域に組み込むことが可能であるが、相同する長い領域を必要とし、また、組み込み効率においてよいものではない。そのため EGFP 発現らい菌構築など、非常に長期に渡り安定した integrate 型蛋白発現抗酸菌構築の手法が求められる。本研究では、integrase による安定な組込み型発現

構築法を検討した。

B. 研究方法

integrase 共発現 EGFP 発現 BCG の安定性検討

抗酸菌ファージ由来プロモーター領域 350bp の領域、および対照として BCG *hsp60* プロモーターを増幅し、integrate 型 pMV306Kan-EGFP の EGFP 配列上流に組込んだ。electroporation 法により BCG へ遺伝子導入を行い、7H10 アガー培地に播いた。単一コロニー菌を 7H9 液体培地により 3 週間継代を行い、EGFP 発現を FACS にて検討した。

trans 型 integrase 発現用 plasmid の構築

pMV261 のプロモーター領域、カナマイシン耐性遺伝子を各々 acetamidase プロモーター、ハイグロマイシン耐性遺伝子に置換し、プロモーター領域の下流に pMV306Kan より、integrase を PCR により増幅し、組み込み、p2HPac int を構築した。pMV306Kan より、integrase を除去し、抗酸菌ファージ由来プロモーターおよびその下流に EGFP 遺伝子を組込んだ p3HΔ int II EGFP を構築した。(図 1)

trans 型 integrase 発現による EGFP 発現

*M. smegmatis*の調整

p2HPac int を *M. smegmatis* に遺伝子導入し、integrase をアセトアミド添加による誘導大量発現を行う組換え *M. smegmatis* を調整した。同菌へアセトアミド誘導後 p3K Δ int II EGFP 遺伝子導入を行い導入効率を検討した。また、p2HPac int 及び p3K Δ int II GFP 両プラスミドを同時に導入する共遺伝子導入を *M. smegmatis* に行った (図 1-B)。

倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来サンプルもしくは動物を使用した実験は行われていない。

C. 研究結果

これまで、プロモーターの発現力比較の際には、菌体内蓄積蛋白による差を避けるため、遺伝子導入後のコロニーを液体培地に接種し、その7日後の菌体を用い、EGFP の発現量を比較してきた。そのため、7日を超えた期間、もしくは継代による検討は、あまり行われなかった。今回の結果、BCG *hsp60* プロモーター発現 BCG の FACS 解析では、単一のピークを形成し安定した GFP 発現集団であった。しかし、強力な抗酸菌ファージ由来プロモーターによる EGFP 発現 BCG は、EGFP 脱落菌の出現のため FACS は、2 峰性を示した。3 回遺伝子導入および EGFP 陽性コロニーからの再クローニングによる菌体を用いても同様の結果であった。

EGFP 脱落の原因として、EGFP の過剰量の蓄積により、菌体への負担が大きくなり、何らかの仕組みで、EGFP 遺伝子が脱落した菌が生育してきたと考えられる。脱落する機序として、共組み込みされた integrase による excision が考えられる。また、他の検討では、recombinase を介した相同組換え BCG は、同種強力プロモーターによる発現であっても継続して6カ月以上の液体培養による継代でも蛋白発現の消失せず安定した発現株が樹立されている。recombinase 系と integrase による本系の相違は、組込みに介する酵素の供給する遺伝子の関係が、trans と cis の相違がある。そこで、組込

まれる遺伝子 p3K Δ int II EGFP と integrase を供給するベクター p2HPac int の2つに分け検討を行った。その結果、あらかじめ、int を発現している *M. smegmatis* への EGFP 遺伝子の導入では、組換え *M. smegmatis* の調整が可能であった。BCG では、p2HPac int を持った BCG 構築を終え、p3K Δ int II EGFP の導入を行っている。一方、p3K Δ int II GFP および p2HPac int の共遺伝子導入系では、現在のところ *M. smegmatis* でもコロニー形成を認めていない。さらなる条件決定検討が必要と考えられた。

D. 考察

M. leprae は、人口培地で培養が未だ不可能なため、プレートによる薬剤耐性選択を行うことはできない。そのため、薬剤の代わりに蛍光色素蛋白を用い、菌液の sorting によるクローニングが考えられる。そのためには、*M. leprae* への遺伝子導入法の検討、マウス体内における長期安定した遺伝子発現が必要とされる。これまでの結果、遺伝子導入や、蛋白発現までは行えることを証明してきた。しかし、今回の結果から、発現らい菌の安定した維持は、さらなる検討を必要とすることが予想された。

BCG における組込み型 EGFP 蛋白発現の不安定の原因として、本研究で検討した integrase による excision の他、EGFP の過剰な菌体内蓄積による細胞毒性が考えられる。哺乳動物細胞用 GFP では、蛋白の半減期が短いものが開発されているが、現在のところ、EGFP 蛋白の抗酸菌内での半減期は知られていない。これらの検討を進めることにより、生菌のみが蛍光を示し、死菌は、光らないことによるらい菌では困難とされる菌の生死判定が可能になると考えられる。さらに本研究は、マウスなど生体内において安定した蛋白発現をする抗酸菌の構築とも考えられる。つまり、発現マーカーの選択や菌体の選択により、in vivo imaging のよい手段となることも考えられた。

E. 結論

integrase の共発現による組換え抗酸菌構築法を開発した。本法は、組換えらい菌調整や in vivo imaging 法開発に有用と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 185: 6234-6243.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 192: 5700-5708.
- 3) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains.

FEMS Microbiol. Lett., 306: 103-109.

- 4) Tsukamoto Y., H. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai and M. Makino. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, in press.

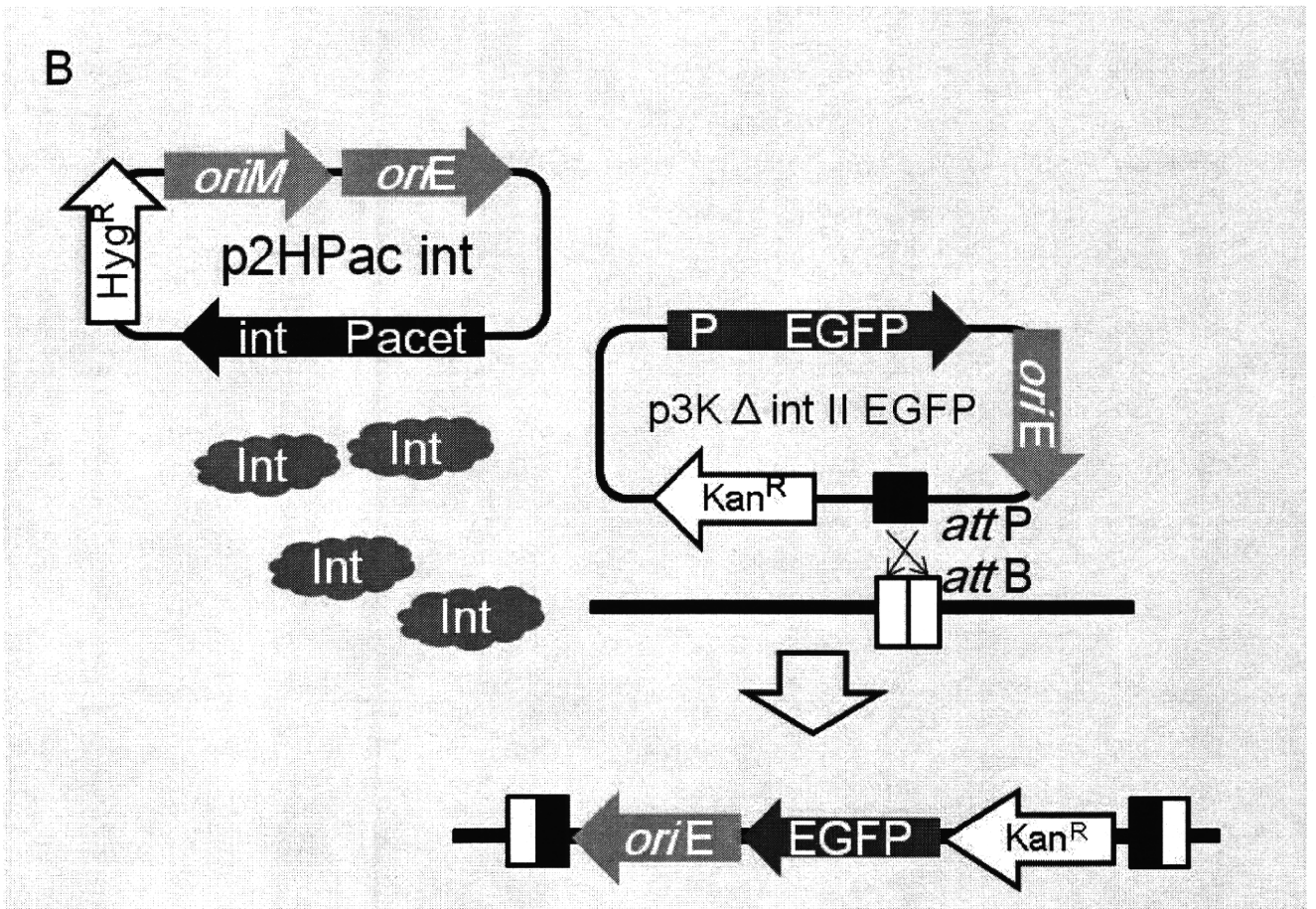
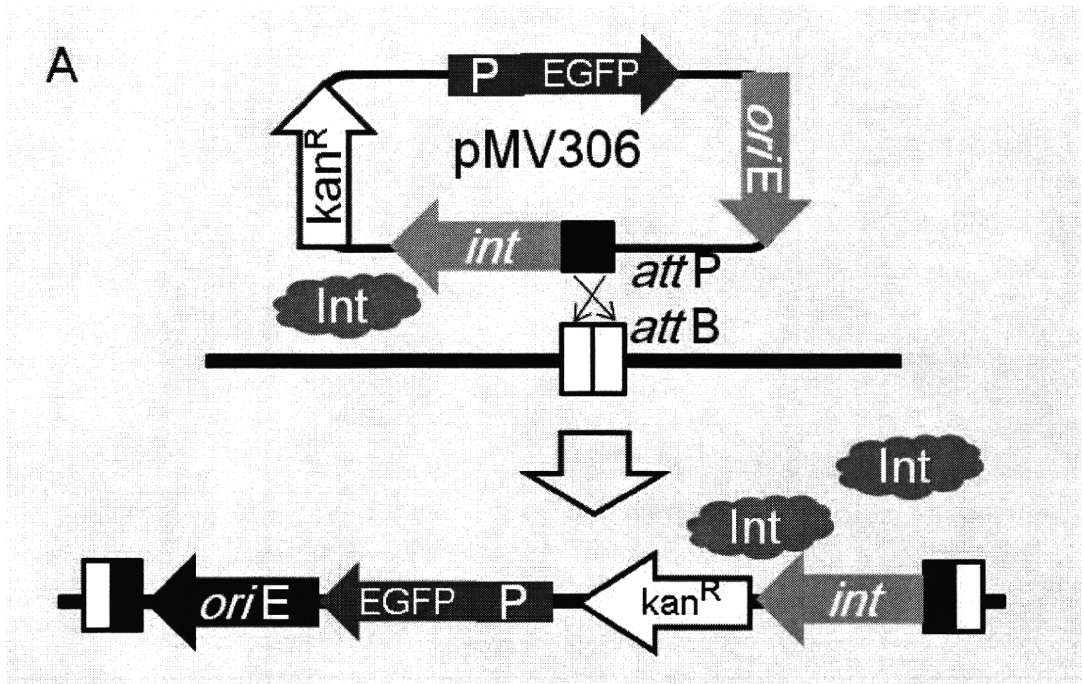
2. 学会発表

- 1) Mukai T., Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, M. Matsuoka and M. Makino. Expression of the fluorescent protein in *Mycobacterium leprae*. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 2) 向井 徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 抗酸菌ファージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第83回日本ハンセン病学会総会 2010年5月 鹿児島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図 1. integrase発現によるEGFP発現*M. smegmatis*調整の概念図



平成22年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)