

平成23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)

結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究

分担研究報告書

研究分担者

小出 幸夫

(浜松医科大学・理事)

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

結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究

研究分担者 小出幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨.

結核菌は典型的な細胞内寄生性細菌である。結核菌はヒトの肺に感染すると、肺胞マクロファージによって貪食されるが、貪食されたマクロファージ内で増殖することができる。この細胞内増殖能は結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構に依存していると言われている。これまでの研究では、Coronin 1a (Coro1a)が、結核菌ファゴソームに局在することによって、ファゴリソソーム形成の阻害が行われていることが示されている。Coro1aノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームとリソソームの融合が促進されて、その結果、結核菌の増殖は阻害されることが示されている。しかし、Coro1aによる結核菌ファゴソームのファゴリソソーム形成阻害機構の詳細はいまだ明らかになっていない。本研究において、Coro1a KD マクロファージに感染した結核菌ファゴソームにオートファゴソーム形成が行われていることを明らかにした。さらに、結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成機構の解析を行った。

A. 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌である。結核菌は感染マクロファージ内においてファゴソームとリソソームの融合（ファゴリソソーム形成）を阻害することによって、増殖能を獲得している。これまでに、ファゴソーム成熟に機能する Rab GTPase が結核菌ファゴソームからかい離することによってファゴソーム成熟が阻害され、その結果、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成が阻害されることを明らかにした。結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成阻害機構として、ファゴソーム成熟に関与する Rab GTPase のかい離機構のほかに、アクチン結合性タンパク質である Coronin 1a (Coro1a) によるファゴリソソーム形成阻害機構が示されている。すなわち、Coro1a ノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおいて、結核菌ファゴソームとリソソーム

の融合が促進されて、その結果、結核菌の増殖は阻害されることが示されている。しかし、Coro1a による結核菌ファゴリソソーム形成阻害における分子機構はいまだ明らかになっていない。近年、マクロファージによる結核菌の殺菌機構として、オートファジーが注目されている。オートファジーは、細胞が飢餓状態になった場合や損傷を受けたときに誘導される、細胞の恒常性維持に機能するタンパク質分解過程である。また、免疫機構において、抗原提示細胞が抗原を効率よく分解、提示するためにオートファジーを利用することが明らかになっている。特に自然免疫機構における感染細胞の細胞質に移行する細胞内寄生性細菌の排除にオートファジーが機能していることが明らかになっている。Coro1a ノックダウンマクロファージ (Coro1a KD マクロファージ) における結核菌殺菌機構を研究している過程で、Coro1a KD マクロファージで

は結核菌ファゴソームにオートファゴソーム形成が誘導されることを明らかにした。本研究では Corola ノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成機構の解析を行った。

B. 研究方法

1. Corola KD マクロファージ

Corola siRNA を Raw264.7 マクロファージに Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入することによって Corola KD マクロファージを調整した。Corola、Atg3、Atg5、Beclin1、ネガティブコントロール siRNA はシグマアルドリッチで合成した。

2. 蛍光顕微鏡法

結核菌 Erdman 株を感染させたマクロファージをパラフォルムアルデヒドで固定した後、抗 LC3 抗体で免疫染色を行った。細胞観察は LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム（横河電機）を用いて行った。

3. 結核菌ファゴソーム画分の調整

Raw264.7 マクロファージに結核菌を貪食させたのち Beatty et al (Cell Microbiol. 2002; 4: 167-76) の方法に従ってファゴソーム画分を単離した。すなわち、結核菌を Raw264.7 マクロファージに 6 時間貪食させて、細胞を回収した。ファゴソーム膜を破壊しないように細胞を破碎した。感染マクロファージ破碎液をショ糖密度勾配遠心分離法、およびフィコール重層遠心分離法を行った。沈殿画分を PBS で洗浄後、結核菌ファゴソーム画分とした。

C. 研究結果

1. Corola KD マクロファージにおける感染結核菌の増殖とファゴリソソーム形成

Corola KD マクロファージに結核菌を感染させて、感染 3 日後における結核菌数を測定した。その結果、Corola KD マクロファージではコントロールマクロファージと比べて感染結核菌の増殖は阻害された。しかし、Corola KD マクロファージにおける結核菌ファゴソームはリソソームとは融合していないことを蛍光デキストランでリソソームをラベルしたマクロファージや抗カテ

プシン D 抗体による免疫染色によって明らかにした。これは、Corola KD マクロファージでは結核菌ファゴソームにおけるファゴリソソーム形成は促進されないことを示す。

2. Corola KD マクロファージにおける結核菌増殖阻害とオートファジー誘導

Corola KD マクロファージにおける結核菌増殖阻害機構を明らかにするために、オートファジー誘導と結核菌増殖との関係を調べた。Corola KD マクロファージをオートファジー誘導阻害剤である wortmannin や 3-メチルアデニン (3-MA) で処理した場合、結核菌増殖阻害は起こらなかった。また、オートファジー関連遺伝子である Atg3、Atg5、Beclin1 を Corola と同時にノックダウンした場合でも結核菌増殖阻害は起こらなかった。このことは、Corola KD マクロファージにおける結核菌増殖阻害機構にオートファジー誘導機構が関与していることを示す。

3. 結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成

Corola KD マクロファージ感染結核菌ファゴソームにおけるオートファゴソーム形成過程を明らかにした。結核菌感染マクロファージを固定して、オートファジーマーカーである LC3 の局在を調べた。コントロールマクロファージでは LC3 は結核菌ファゴソームに局在しなかった。Corola KD マクロファージでは感染 6 時間後に LC3 が局在する結核菌ファゴソーム数が増加した。また、電子顕微鏡法によっても、結核菌ファゴソームの周りにオートファジー誘導に特異的な膜構造が局在していることが明らかになった。このことは、Corola KD マクロファージでは感染結核菌にオートファゴソーム形成を行うことを示す。

4. 結核菌ファゴソームにおける LC3 の局在次に、結核菌ファゴソームにおける LC3 の局在を生化学的に解析した。結核菌ファゴソームを生化学的に単離して、SDS-PAGE の後に抗 LC3 抗体でウェスタン解析を行った。Corola KD マクロファージから単離した結核菌ファゴソームにはコントロールに比べ

て2倍以上のLC3が局在していることが明らかになった。また、オートファジー誘導阻害剤である wortmannin や 3-MA 処理、オートファジー関連遺伝子である Atg3、Atg5、Beclin1 に対するノックダウンは Corola ノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームへのオートファゴソーム形成を減少させることを蛍光顕微鏡法によって明らかにした。

5. 結核菌肺胞マクロファージにおけるオートファジー誘導

肺胞マクロファージ細胞株である MH-S に結核菌を感染させた。コントロール肺胞マクロファージでは結核菌ファゴソームに LC3 は局在しなかったが、Corola KD 肺胞マクロファージでは結核菌ファゴソームに LC3 が局在した。このことは肺胞マクロファージでも Corola をノックダウンすることによって感染結核菌にオートファゴソーム形成を誘導することを示す。

D. 考察

これまでの研究では、Corola は結核菌ファゴソームに局在することによって、ファゴリソーム形成の阻害が行われていることが示されていた。すなわち、Corola は結核菌ファゴソームに局在することによる物理的障壁として、さらに、Corola はカルシニューリンの活性化を行うことによって、結核菌ファゴソームとリソソームの誘導を阻害することが示されていた。しかし、本研究では Corola KD マクロファージにおいて、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソーム形成は促進されないが、感染結核菌の増殖は阻害されることを明らかにした。さらに本研究によって、Corola KD マクロファージにおける結核菌増殖阻害には感染結核菌のオートファゴソーム形成が関与することが明らかになった。結核菌はファゴソームにとどまる細胞内寄生性細菌であると考えられてきた。しかし、近年の研究成果によって、感染後期においてファゴソームから細胞質へ移行することが明らかになっている。また、結核菌病原因子である ESAT-6 は細胞膜障害活性を有していることが報告

されている。結核菌は Corola KD マクロファージではファゴソーム膜を溶解して、細胞質に移行する。その結果、細胞質内でオートファゴソーム形成が行われていることが示唆される。

本研究成果は、アジアにおける結核蔓延国でのヒト Corola 発現と結核感染との関係を明らかにすることによって、新しい結核治療薬、治療方法の開発に貢献する可能性を示す。

E. 結論

アクチン結合性タンパク質である Corola はマクロファージに感染した結核菌へのオートファゴソーム形成を阻害する。その結果、感染結核菌の細胞内増殖は促進される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic.*, 12: 407-420.
- 2) Sugaya, K., S. Seto, K. Tsujimura, and Y. Koide. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410: 371-375.

2. 学会発表

- 1) Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome maturation. International Union Microbiological Society (IUMS) 2011 Congress, Sep 6-10, 2011, Sapporo, Japan.
- 2) Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Localization and function of

Coronin-1a in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages.
46th US-Japan Conference on
Tuberculosis and Leprosy, Dec 6-8,
2011, Saitama, Japan.

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23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）

研究協力者 和田 崇之 （大阪市立環境科学研究所）

研究要旨.

結核菌の臨床分離株には遺伝的多様性があり、各菌株には点変異や遺伝子欠損など、ゲノムレベルでの様々な個性が存在している。菌株間の相同性や異同判定を行う「結核分子疫学解析」ではその遺伝的個性をマーカーとして用いる。より信頼性の高い菌株分析を行うためには、既存の VNTR 型別に代表されるような多型領域の解析のみならず、より高精度かつ詳細な変異情報の蓄積が不可欠である。本課題では、昨今において発展が著しい次世代シーケンサーを用いて臨床分離株の遺伝情報をゲノムワイドに解読し、その情報を蓄積・比較することにより新しい遺伝型別の構築とそれに根ざした分子疫学、すなわちゲノム疫学の創出を試みる。本年度は我が国で定着分布を示す祖先型北京株のうち、東アジア全域でも比較的高頻度に分離される亜系統群 G5/6 に着目し、次世代シーケンサーによってゲノム配列を解読した臨床分離株（3株）について固有変異の抽出を行った。Genome Analyzer II (Illumina) では、結核菌のゲノムサイズ（約 4.5 Mbp）において 1 ランあたり少なくとも 6 株のマルチプレックス解析においても充分なリード数が確保された。獲得された配列データはアライメントツール Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いたマッピング解析によって良好に変異抽出が可能であり、本課題で実施した一連の解析フローが今後想定されるゲノム比較の多検体化において効率よく機能しうると考えられた。変異マッピングでは、各株とも約 120 か所の固有置換変異 (SNPs) が見出された。これらは G5/6 群を遺伝型別的に細分化する際に有用な変異情報として活用できる。

A. 研究目的

結核患者由来結核菌株には遺伝子レベルの多型性があり、菌株間の相同性や異同判定に際し有用な情報源となる。近年、世界各地で分離された結核菌株の遺伝多型解析から、各地域にはそれぞれ優先的に分離される結核菌系統が存在していることがわかってきた。このような知見から、結核菌は各地域内での限局的な伝播と定着を経ながら、地理特異的もしくは宿主（民族）特異的な適応進化をそれぞれの地域内で確立してきたと考えられるようになってきている。

東アジア地域では、「北京型」と呼ばれる系統群に属する結核菌株（北京株）が数多

く分離されることが知られている。北京型結核菌は遺伝型別によって「祖先型」「新興型」に分類される。さまざまな地域で分離された北京株について詳細な遺伝型別解析が報告されているが、祖先型が優先株として分布しているのは日本国内のみであることが明らかとなっている。反面、新興型北京株は東アジアのユーラシア大陸部をはじめ世界各地に蔓延、拡散しており、病原性や抗原性など様々な点においてその特異性に関する実験的検証が進められている段階である。

我々は国内の北京株を詳細に分析し、既知の点変異多型 (SNPs) によって主に 5 つ

の亜系統群（系統発生順に G1/2, G3, G4, G5/6, G7/8, G9）に細分類可能であることを見出している。このうち G2, G3, G4, G5/6 が祖先型に、G7/8, G9 群が新興型に属している。これらの亜系統群はそれぞれ遺伝的に単系統であり、段階的に分岐しながらそれぞれが独立的に国内で定着してきたことが推定される。

祖先型北京株のうち、大陸部においても分離頻度が高い亜系統群が G5/6 である。同亜系統群は我が国において最も高頻度に分離される（北京型株の約 30-40%）だけでなく、既存の遺伝型別解析（variable number of tandem repeat, VNTR 法）において一致を示す特定株の出現頻度が高く、未知の伝搬経路もしくは過去における集団感染とその再発に起因する分離傾向を示している。一方、他国での分離頻度は新興型に次いで高く、これまでに中国（上海周辺）29.5%、韓国 9.4%、タイ 17.2%などの報告がある。亜系統群全体の傾向としては、VNTR 型別で高い多様性が観察されており、長期間に及ぶ定着と適応進化が起こっている可能性が示唆されている。

近年、次世代シーケンサーの発展に伴い、比較的安価かつ容易に大量の塩基配列を解読できるようになってきた。ゲノム配列全域を対象とした比較（ゲノム比較）では、菌株ごとの個性を網羅的に抽出できるだけでなく、その変異情報を他の菌株で検証することによって精度の高い異同判定、相同性解析が可能となる。結核菌においても菌株の相同性を明らかにする上で高い信頼性を得ることができ、これまで VNTR 解析が志向してきた「未知の伝搬経路の発見」とは異なった分子疫学情報、すなわち「地域(国)での分布菌株の傾向」「時系列的な菌株群トレンドの変遷」を浮き彫りにすることができる。

本課題の研究目的は、次世代シーケンサーによって解読された G5/6 株の塩基配列情報を分析し、各株の固有変異情報を抽出することである。ゲノム比較から得られた固有変異を遺伝型別解析に適用することによって極めて精巧な菌株の遺伝学的定義を与

えることが可能であり、いわゆる「結核分子疫学」から「結核ゲノム疫学」への転換を見通すことができる。とりわけ、本課題では祖先型 G5/6 を解析対象とすることにより、我が国の分離株を材料とした独創性を維持すると同時に、東アジアを中心とした国際比較解析を行うための基礎データとして利用することが可能である。

B. 研究方法

本邦において分離される G5/6 株は VNTR 型別で特徴的な 3 つのサブグループが確認されている。本課題ではこれらからそれぞれ 1 株ずつを選び、計 3 株を同亜系統群のゲノム比較対象株とした。

次世代シーケンサーは Genome Analyzer IIx (GAIIx, Illumina) を選択した。他の菌株と合わせて計 6 株のゲノム DNA を抽出してそれぞれ断片化し、DNA バーコードを付加して混和後、バイアスフリー配列解析を実施した。解析配列長は各リード 75 bp×2（ペアエンド）とし、得られた配列データは DNA バーコード配列によって再分配した後、各株由来の配列情報として扱った。

獲得されたリード配列のうち、解析精度が低い塩基配列についてはミスリードの原因となることがあるため、あらかじめトリミング処理を行った後、マッピングによる変異抽出を実施した。H37Rv 株の完全ゲノム配列（AL123456.2）をリファレンスとし、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) によるアライメントマッピングならびに Samtools による変異箇所の抽出を行った。変異配列は少なくとも 30 リード以上の解析深度が得られ、かつ単一の塩基（A, C, G, T）が得られている部位をソートした。

倫理面への配慮 本研究に供試された結核菌株および次世代シーケンサー解析によって得られた塩基配列情報（ゲノム情報）は、研究分担者および研究協力者の所属機関において継続的に集積されているものである。各菌株については、個人情報の特定制が不可能となるように番号をつけ匿名化し、プライバシーに配慮している。本課題にお

ける菌株の利用は未知の結核感染源推定に重要な情報を与えうるものであり、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」に適合している。

C. 研究結果

GAIIX によるマルチプレックス解析から、各株約 400 Mbp 相当のリードデータが取得できた。同データ量は結核菌ゲノムサイズのおよそ 90 倍にあたり、マッピングによる変異同定およびアセンブリ解析による特異配列の探索において充分であると考えられた。本結果は、多検体処理においても GAIIX の解析力が同菌のゲノム解読に十分なデータ量を供給しうることを意味している。

通常、次世代シーケンサーによる大規模配列解析では、ゲノム DNA を PCR によって増幅した後に鋳型として用いることが多い。本解析ではあらかじめ培養菌量を増やし、ゲノム DNA を多量に利用することによって同工程を省略するバイアスフリー解析を選択したところ、以前に行った同等の解析と比べ、マッピングされた領域におけるリード数の不均一性が著しく改善されることが確かめられた。この結果は、結核菌ではゲノム DNA の PCR において不均一な増幅が引き起こされることを示唆しており、抗酸菌特有のゲノム構造（高 GC 比など）の影響によるものと推定される。

BWA によるマッピング解析の結果、各株とも H37Rv 株に対しておよそ 1,300 か所の置換変異が見出された。このうち各株に固有な変異はそれぞれ約 120 か所であり、これらは G5/6 群を遺伝型別的に細分化する際に有用な変異情報として活用できる。また、VNTR 型別が互いに近似していた 2 株において 28 か所の共有変異が認められ、比較的新しく共通祖先から分岐した株であることが確かめられた。

各株ともに変異はゲノム全域にわたって見いだされており、特定の機能遺伝子が淘汰圧を与えている可能性については断定不可能であった。遺伝型別として菌株個性・変異箇所を利用する場合においては、逆に菌株個性（表現型）に影響を与えない変異

を選択した方が望ましいとされているが、そのような変異として代表的な遺伝子間（intergenic）変異は今回の 3 株において 9-22 か所が抽出されており、各株でばらつきが認められる結果となった。

D. 考察

本年度は、これまで行ってきた結核菌臨床分離株のゲノム比較に次世代シーケンサーを導入し、より正確かつ信頼性の高い配列情報を取得することができるようになった。前年度までに用いた手法はマイクロアレイによる変異箇所の検索・同定（comparative genomic hybridization, CGH）であったため、菌株固有の配列（リファレンスゲノム配列に含まれない塩基配列）に関する情報を取得できず、詳細なゲノム比較を行う上で大きな問題を残していた。次世代シーケンサーによって得られるリード配列はそのような部位も含んでいるため、分離株ゲノムの配列情報を随時蓄積することによってさまざまな比較解析が可能になると期待される。一方で、マッピングによる変異解析では、CGH で見出されていた変異数とほぼ同等の変異が見出されている。BWA はリード配列をそのままゲノム配列にマッピングするアライメントツールであるため、特に PE/PPE 遺伝子をはじめとした相同遺伝子の周辺では、なお問題を残す選択肢であると言える。条件設定や解析ツールの取捨選択、アセンブリ解析の併用など、精度の高いマッピング手法を確立することが必要になると考えられるが、現在そのようなツールは開発途上にあり、バイオインフォマティクスの発展が望まれるところである。

本年度の研究成果には、バイアスフリー解析の有用性を確認したこととマルチプレックス解析による菌株あたりのコストを劇的に抑えたことも挙げられる。これらの結果から、次世代シーケンサーを用いた結核菌ゲノム情報の取得について、一定のアウトラインを構築できたと言える。今後も次世代シーケンサーは解析機器や試薬のバージョン更新が予定されており、単価あたりの取得データ量はさらなる増加が見込まれ

ている。コストパフォーマンスの向上に伴って、より多数の菌株を扱った比較ゲノムとそれに基づく分子疫学的研究はいつそう加速すると考えられ、本課題はその展開に先駆けた取り組みとして位置付けることができる。

G5/6 株は、研究目的の項でも述べたとおり、東アジアにおける定着群としての特徴がある。VNTR 型別による比較では、新興型株ではより近似した型別が数多く分離するのに対して、G5/6 では比較的相関性が低い菌株群によって構成されている。このことから、各地域（国）の G5/6 群株に固有の遺伝的特性や優先株の存在が見出される可能性がある。現行の VNTR 型別ではこのような地域的偏向分布は確認されておらず、今回行われたゲノム比較から見出された SNPs による系統分類がその詳細を分析する糸口として期待できる。具体的には、G2 株特異的 SNPs を韓国由来株で分析することによって、その特徴的な分布頻度が観察された（昨年度の本課題における成果：投稿準備中）のと同様に、各地域から分離された G5/6 株についても同様の SNPs 解析を実施し、その内部構造と分布を比較することによって、次年度以降への研究展開に繋げることを検討中である。

E. 結論

結核菌株のゲノム比較を目的とした次世代シーケンサーの活用は、マルチプレックス（多検体処理）解析においても十分なデータ量を供給し、菌株の固有変異同定に役立てることが可能である。本課題ではその分析において BWA によるマッピングを実施し、各株の変異情報を抽出した。その結果、東アジア地域に蔓延する北京型結核菌のうち、長期間にわたり定着傾向を示す G5/6 亜系統群からゲノム比較対象株を選び、各株の共通／固有変異を抽出し、今後の分子疫学的解析に有用な塩基配列情報を得た。

本課題によって確立された次世代シーケ

ンサーデータの解析フローは、そのコストパフォーマンス向上によって想定される解析株の追加およびデータ集積に寄与するものである。

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ム個性解析. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 京都
- 2) 和田崇之, 岩本朋忠, 長谷篤, 前田伸司. 本邦における結核菌臨床分離株の地理生物学的特性と遺伝的多様性. 第 5 回日本ゲノム微生物学会年会 2011 年 3 月 仙台
- 3) Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Atsushi Hase, and Shinji Maeda. Characterization of genomic specificity and diversity observed in *Mycobacterium tuberculosis* at the east end of Asia. FEMS Microbiology Congress 2011, 26-30 June, 2011, Geneva, Switzerland.
- 4) Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Shinji Maeda, and Atsushi Hase. Comparative Genomics refines phylogeographical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* at the east end of Asia. 45th US-Japan Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 7-9, December, 2011, Ohmiya, Japan.

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23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 松下育美（国立国際医療センター研究所・呼吸器疾患研究部・研究員）
研究協力者 田中崇裕（国立国際医療センター研究所・呼吸器疾患研究部・研究員）
研究協力者 櫻田紳策（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の進展には、宿主免疫の質および量が深く関与している。これら宿主の免疫状態は、自然免疫、獲得免疫ともに、遺伝素因、基礎疾患、合併症、使用薬剤、栄養状態など、さまざまな要因の影響を受けている。我々は、これらの要因の中で、本年度、栄養の指標に注目して検討を進めた。ベトナムの医療機関との国際共同研究を進める中で、新規塗抹陽性結核患者の治療前、2か月後、7か月後の栄養指標として、Adiponectin、Leptin、Fetuin-A、RBP4 に注目して、それらの血中濃度を測定し、結核潜伏感染者を含む非発症対照集団との対比を行った。その結果、各指標はそれぞれ異なる動態を示し、一概に栄養指標といっても異なる状態を反映していることが推測された。途上国では、近年、糖尿病など生活習慣病と感染症の二重負担が深刻であることから、これらの栄養指標を用いたアプローチはその二重負担の両面を同時に検討する上で有用なアプローチと思われた。

A. 研究目的

結核は、現在も世界人口の3分の1が感染し、年間の新規発症者数1,000万人弱、有病者数1,500万人弱、死亡者数は、HIV合併者を中心に150万人以上と言われている。近年、アジアの開発途上国を中心に、糖尿病など生活習慣病と感染症の二重負担が深刻な問題となりつつある。

言うまでもなく、わが国で生活習慣病はきわめて大きな問題であり、国民病として医療費を圧迫している。必然的に、肥満、糖尿病、動脈硬化に関する多くの研究がなされている。

一方で、低栄養と過栄養の両極における易感染性の問題は临床上よく知られているにもかかわらず、国内では十分に研究されていない。このような情勢を踏まえて、開発途上国の栄養指標と感染症の関係について新たな視点で研究することは、わが国の医療にも貢献することが期待される。特に

わが国と遺伝的背景に近いアジアの国々と広く国際的共同研究を行うことは有益である。

結核発症とその病態の進展には、宿主免疫の質および量が深く関与している。これら宿主の免疫は、便宜上、自然免疫、獲得免疫に大別されて論じられるが、いずれも、遺伝素因、基礎疾患、合併症、使用薬剤、栄養状態など、さまざまな要因の影響を受けている。

我々の研究室では、最近、活動性結核患者の血液中で健常者に比べて有意に低値を示すタンパク質をプロテオミックスの手法により複数個同定したが、これらのタンパクの多くは脂肪細胞や肝細胞から分泌され、栄養代謝に関連するタンパク質であり、免疫との関連も示唆されるものであった。そこで今回、ベトナムとの国際共同研究において、これら栄養代謝指標の結核における臨床的意義を従来から知られるその他の栄

養指標とともに検討した。

B. 研究方法

ベトナム、ハノイ市において、共同研究機関として、ハノイ市肺病院およびハノイ市の7つの郡の結核センターに協力を要請し、新規塗抹陽性活動性結核患者46名（男性42名、女性4名、年齢中央値47歳 四分位範囲35-55歳）について、治療前、治療2カ月後、治療7カ月後の血漿サンプルを検討に用いた。対照群としては、医療従事者で QuantiFERON TB-in tube 法により、潜伏感染に関する情報が知られている84例（男性41名、女性43名、年齢中央値40歳 四分位範囲28-49歳）を対象に検討を行った1）。

研究参加者選定基準は、治療開始時に、新規喀痰塗抹陽性の活動性結核患者で、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）、HIV合併、悪性腫瘍の合併、免疫抑制療法中の者は除外した。

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。

倫理面への配慮

研究計画はベトナム、ハノイ市肺病院と国立国際医療研究センターの倫理審査委員会にて承認されている。今回報告する研究部分はタンパク解析研究であり、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を実施する可能性があったため、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。

研究参加者については、現地の試料提供施設で説明文書を用い説明し、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、わが国には記号でのみ送られることとした。各血液試料に記号のついたラベルを貼付した。個人情報と記号を対応させ

たファイルはハノイ市病院の鍵のかかる部屋に保管され、同病院の企画部に所属する医師が個人情報管理者となった。

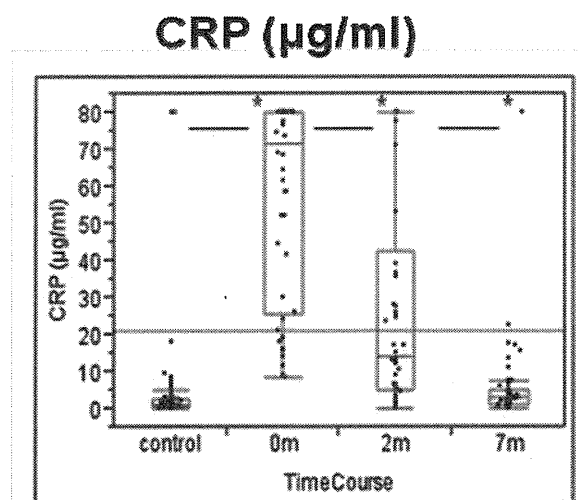
血漿中の各種指標、すなわち CRP、Adiponectin、Leptin、RBP4、Fetuin-A については、それぞれ市販の ELISA 系を用いて測定した (Assaypro、R&D system、Takara ほか)。

統計解析は、JMP 8.0.2 (SAS institute JAPAN) パッケージにより、対応のない2群間の値の差異については Wilcoxon 順位和検定、対応のある2群間の値の変化については Wilcoxon 符号付き検定、2つの連続変数の相関については Spearman の相関係数および P 値を求めて、解析を実施した。

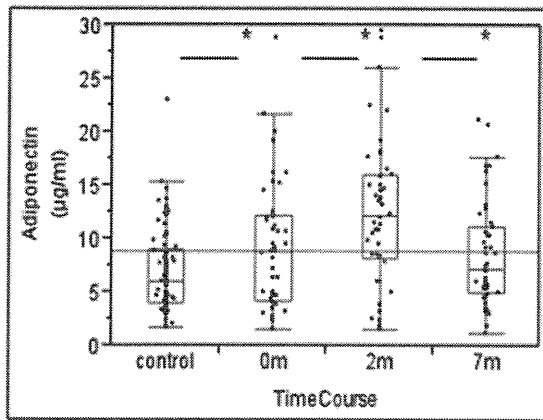
C. 研究結果

1. 血漿中、CRP、Adiponectin、Leptin、Fetuin-A、RBP4 の血中濃度の測定

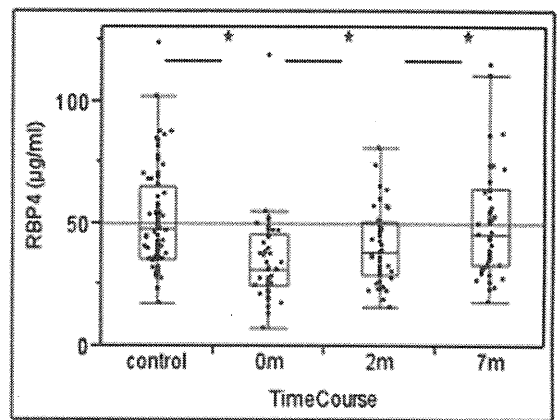
図1に新規塗抹陽性結核患者と非発症対照集団の血漿中、CRP、Adiponectin、Leptin、Fetuin-A、RBP4 濃度を対比して示した。患者集団については、さらに治療前(0m)、2か月後(2m)、7か月後(7m)の各指標の推移を示した。



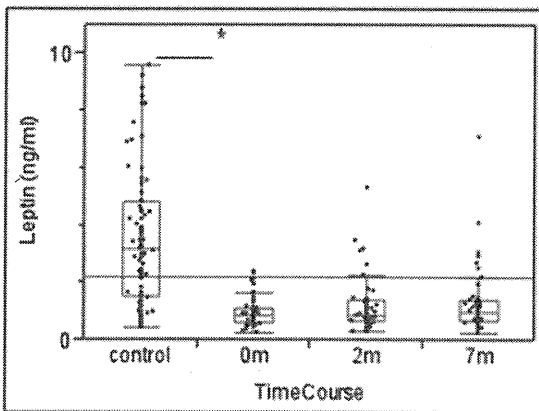
Adiponectin (μg/ml)



RBP4 (μg/ml)



Leptin (ng/ml)



Fetuin A (μg/ml)

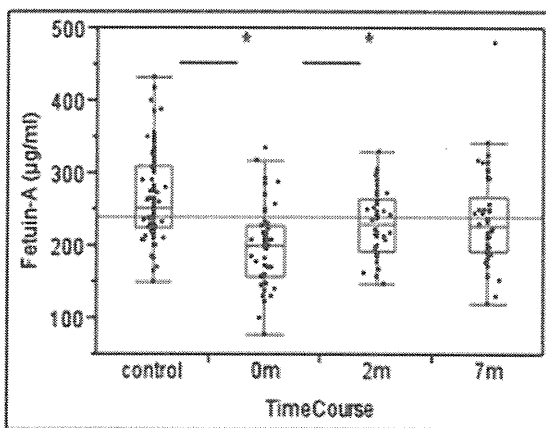


図1 新規塗抹陽性結核患者の治療前(0m)、2か月後(2m)、7か月後(7m)の血漿中、CRP、Adiponectin、Leptin、Fetuin-A、RBP4の血中濃度の推移と結核潜伏感染者を含む非発症対照集団との対比 (* $P < 0.01$)

CRP 値は、非発症者では低値を示し、治療前値が最高であり、治療後、徐々に低下して、治療終了直前にはほぼ対照群と変わらないレベルに下がった。

Adiponectin 値は、対照群に比して、治療前でやや高値を示し、治療早期にさらに上昇し、その後、治療終了直前には、ほぼ対照群と変わらないレベルまで下がった。

Leptin 値は、治療経過につれて上昇する例もみられたが、多数は対照群に比べて、治療経過を通じて一貫して低値を示した。

Fetuin-A 値は、未治療患者群では対照群に比べて低値を示したが、治療早期に回復し、その後は、対照群よりは若干低値のまま推移した。

RBP4 値は、治療経過を通じて、徐々に上昇して、治療終了直前には、対照群に近いレベルまで回復した。

また、データとして示していないが、年齢、男女比を勘案してもこれらの傾向は、不変であった。また、対照群における QuantiFERON の判定結果(陽性、陰性)と各種指標との間に関連は認められなかった。

2. body mass index (BMI) と各種血中指標との相関

表 1 A 対照群における body mass index (BMI) と各種血中指標との相関

Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
CRP ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	0.3473	0.0012*
Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	-0.4411	< 0.0001*
Leptin (ng/ml)	BMI	0.4539	< 0.0001*
Fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	-0.0044	0.9686
RBP4 ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	0.2321	0.0336*
RBP4 ($\mu\text{g/ml}$)	Fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$)	0.1892	0.0848

表 1 B 結核群における body mass index (BMI) と各種血中指標との相関

Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
CRP ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	-0.0749	0.6208
Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	-0.3694	0.0115*
Leptin (ng/ml)	BMI	0.3037	0.0402*
Fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	0.1217	0.4202
RBP4 ($\mu\text{g/ml}$)	BMI	0.2356	0.1149
RBP4 ($\mu\text{g/ml}$)	Fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$)	0.446	0.0019*

* 太字は、有意な相関を示した組み合わせと P 値

対照群では、Leptin 値が最も良く BMI と相関して、RBP4 値がこれに次いで正の相関を示した。Adiponectin は BMI と強い負の相関を示した。

治療前の結核群では、Leptin と BMI との正の相関、Adiponectin と BMI の負の相関が認められたが、RBP4 値は BMI とは相関を示さず、むしろ RBP4 と Fetuin-A との間に

強い正の相関を認めた。

D. 考察

我々の研究室では、これまで結核患者と対照者の血漿タンパクを二次元電気泳動により分離し、質量分析装置で同定することにより、プロテオミックスの手法により、結核と関連する新規バイオマーカーの探索を行ってきた。その結果として、血漿中 Fetuin-A 値と RBP4 値が活動性結核患者で有意に減少していることを見出し、2011 年に報告した 2)。これらのマーカーは、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病などとの関連が報告されており、また低栄養、過栄養の指標としても利用されている。

しかしながらこれらの指標に加え、Leptin, Adiponectin など脂肪細胞から分泌される栄養指標がそれぞれ、結核の感染、発症、治療に伴う炎症の消退とどのように関連し、どのように推移するかについては、十分に検討されたとはいえず、また治療応答性や再発との関連についても、結論は得られていない。

宿主の栄養状態が宿主の感染防御免疫能に深く関連することは臨床疫学的によく知られており、動物モデルによる実験的根拠も多く報告されている。また栄養状態は介入し、改善可能な要因であることから、栄養と感染症の問題を適切なバイオマーカーを用いて検討することは重要である。そこで、今回、これらの点について、結核症に関する臨床研究を実施し、包括的に検討を試みた。

その結果、各栄養指標は、治療経過により、それぞれ異なる動態を示すことが明らかになった。すなわち、Leptin は、炎症により大きな変動を示さず、栄養状態、体脂肪の一貫とした指標としての役割を示していた。RBP4 も非炎症状態では、栄養状態、体脂肪の指標となっていたが、炎症状態では減少して、むしろ炎症指標（陰性の急性相反応物質）としての性格が優勢となっていた。Fetuin-A は、もともと体脂肪量を反映する指標ではなく、炎症時には、RBP4 と同様に炎症指標（陰性の急性相反応物質）

として減少し、炎症の消退とともに、回復することが明らかになった。これらの指標と免疫能との直接の関連については今後さらなる研究が必要である。

なお、本報告書で、詳細は割愛したが、結核の潜伏感染、治療後の速やかな排菌の消失、再発と各種栄養指標との間に有意な関連は認められなかった。しかし、少数例の検討による検出力の問題も考慮する必要があり、今後のさらなる検討を要するものである。

E. 結論

ベトナムの医療機関との国際共同研究を進め、新規塗抹陽性結核患者の治療前、2か月後、7か月後の栄養指標として、Adiponectin、Leptin、RBP4、Fetuin-A に注目して、その血中濃度を測定し、結核潜伏感染者を含む非発症対照集団との対比を行った。各指標は、それぞれ異なる動態を示し、一概に栄養指標といっても異なる病態を反映していることが示された。特にアジアの途上国では、近年、糖尿病など生活習慣病と感染症の二重負担が深刻であることから、これらの栄養指標を用いたアプローチはその二重負担の両面を同時に検討する上で有用と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hang, N. T., L. T. Lien, N. Kobayashi,

T. Shimbo, S. Sakurada, P. H. Thuong, L. T. Hong, D. B. Tam, M. Hijikata, I. Matsushita, N. V. Hung, K. Higuchi, N. Harada, and N. Keicho. 2011. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for tuberculosis. PLoS One, 6: e23806.

2) Tanaka, T., S. Sakurada, K. Kano, E. Takahashi, K. Yasuda, H. Hirano, Y. Kaburagi, N. Kobayashi, N. Hang, L. Lien, I. Matsushita, M. Hijikata, T. Uchida, and N. Keicho. 2011. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. BMC Infect. Dis., 11: 71.

2. 学会発表

1) 田中崇裕, 櫻田紳策, 加納圭子, 鏑木康志, 小林信之, 慶長直人. 結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索. 第34回日本分子生物学会年会, 12月13-16日, 横浜, 2011.

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23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）

研究要旨.

病原体の感染機序解析や新規薬剤開発において、蛍光蛋白や luciferase 等の発光マーカーは、直接的観察が可能なため汎用されている。しかし、蛍光蛋白では、励起光の到達する距離に発光は依存し、luciferase では、基質の投与や添加が必要なため、in vivo imaging 等においてその使用に制限がかかる。自家発光である Bioluminescence 系は、励起光や基質添加が不要なため、より有用な発光マーカーと考えられる。そこで、抗酸菌への応用のため、promoter の選択、塩基配列の解析、各 ORF の BCG codon usage 至適化検討を行い、抗酸菌において強力な発光を示す bioluminescent を構築した。これは抗酸菌の in vivo imaging の進展とアジアに存在する伝統薬等未知の候補化合物の薬剤効果判定を容易にし、新薬開発に大きく寄与すると考えられた。

A. 研究目的

感染症の体内動態解析、感染機構解析、新規薬剤開発において、蛍光蛋白や luciferase 等の発光マーカーを発現する病原体は、直接的観察が可能なため非常に有効な手段として用いられている。蛍光蛋白は、発光に励起光を必要とする。そのため in vitro の解析には、多色を用いた解析も可能である。しかし、in vivo 解析では、皮膚深部 5mm 程度までしか励起光は到達しないため、深部の観察は困難である。また、化学発光であるホタル等の luciferase による発光の系では、基質の添加や投与を必要とするため、発光をさせる基質の体内必要量が莫大なものとなり、また、基質の体内拡散動態が大きく影響する。これらの難点に対し、bioluminescent の系では、励起光や基質添加が不要なため、新たな発光蛋白として見直されている。本研究では、抗酸菌への同蛋白の応用を図ることを目的とした基本的な開発を進めた。

B. 研究方法

Bioluminescent として pXen13 (Caliper, MA, USA) にコードされた *Photorehabdus*

luminescens 由来 G(-) 至適化 *luxCDABE* オペロンを用いた。同オペロンを BCG の codon usage へ至適化 (TAKARA) を行った。発現用ベクターとして、抗酸菌組込み型である pMV306K を基本に、プロモーターとして *hsp60* promoter、もしくは抗酸菌ファージ由来 promoter P86 を用いた。*hsp60* promoter 下流に pXen13 由来 operon を持つ p3K 60-13 をコントロールとし、全 ORF 及び ORF 間配列の BCG codon usage 至適化した p3K CDABE_{my}、各至適化 ORF の各種組み合わせを持つ plasmid を作製し、大腸菌、*M. smegmatis*, *M. bovis* BCG に導入し、その発光度を比較した。測定は、Light capture II (ATTO) により画像を取り込み、CS Analyzer ver 3.0 (ATTO) を用い解析した。また、液体培養の発光は、MicroLumat Plus LB96V (ベルトール JAPAN) を用いた。

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

pXen13 由来の CDABE の promoter 比較で

は、*hsp60* promoter より、遥かに P86 promoter による発光強度は強かった(図 2)。これまでの報告では、同 ORF を用い各種 promoter による抗酸菌における発光比較が行われ、*hsp60* promoter 由来が最も強いとされていた。しかし、今回抗酸菌ファージ由来の promoter では明らかな違いを示した。さらに、ORF の BCG 至適化による影響を検討した。全 ORF 及び ORF 間隙を BCG codon usage に至適化した plasmid p3K CDABEmy は、大腸菌、*M. smegmatis*, *M. bovis* BCG において発光は認められなかった。そのため、GenBank の配列情報と実際の plasmid, pXen13 の operon CDABE 配列を解読した。その結果、GenBank と実際の plasmid 配列では、4 か所のアミノ酸置換と ORF 間に Adenine の 1 塩基付加が認められた(図 1)。これらの変異による発光度への影響を検討するため p3K 60-13 に同変異を導入し、発光度を検討した。その結果、4 か所のうち 1 アミノ酸変異及び、Adenine の 1 塩基付加が、発光に影響を与えていることが判明した。すなわち、BCG codon usage 至適化 plasmid は、GenBank 登録の配列を基に合成されたため、p3K CDABEmy は、どの宿主でも発光しなかったと考えられる。同定された 1 アミノ酸変異修復と A 付加を行いさらに検討を進めた。operon CDABE のうち、C, D, E は基質の合成に、A, B は、酵素をコードしていることが知られている。CD, AB, CDE, CDAB, CDABE の各組み合わせの ORF BCG 至適化 plasmid を構築し、その発現を各種宿主で比較した。その結果、全 ORF が至適化された plasmid が、最も発光すると予想されたが、CD, AB の ORF の BCG 至適化 plasmid が、強い発光を示した。(図 2)

D. 考察

蛍光蛋白などの発光蛋白を発現している菌は、その存在がリアルタイムに観察できる。現在様々な色を発色する蛍光蛋白が開発され、蛍光抗体と組み合わせることにより菌と細胞成分との相互作用が詳細に研究されている。一方 luciferase では、その

光の特性より極少量の発光でも検出が可能であり、新薬の効果判定や、細菌の生死判定に利用されている。これまで、in vitro において各種発光蛋白の応用がなされているが、癌の研究分野等でマウスの体内、in vivo での応用が進められている。しかし、蛍光蛋白は、励起光が必要であり、皮膚深部 5 mm が限界といわれている。体内臓器への応用では、解剖を伴うため経時的な観察は困難である。また、luciferase は、高感度の検出系を用い、より深部の発光の観察が可能である。しかし、発光作用に必要な基質を体内に投与する必要があり、均一な基質の体内分布は非常に困難であり、特に肺深部等の末端への分布は、均一性に欠けることが知られている。これらに対し、bioluminescence の系は、luciferase の系に基質合成を同梱するため、自家発光を基質投与なしに行う。これまで様々な菌種において応用が試みられているが、抗酸菌に適したものの開発は成功していない。その大きな原因は、結果に示した、plasmid 配列と登録配列の相違にある。その相違を修正することにより、promoter の選択、至適化する ORF の確定により、抗酸菌での発光度が飛躍的に向上した。これは、感染症の解析応用およびアジアに多く存在する伝統薬など未知の化合物を用いたより容易な新薬開発法への可能性が開かれたと考えられた。

E. 結論

抗酸菌に適した bioluminescent の開発は、in vivo imaging や新薬開発に有用なものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, in press.
- 2) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y.

Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.

2. 学会発表

- 1) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi and M. Makino. Identification of novel promoter of mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent *-Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011, 6-10, July. Sapporo, Hokkaido, Japan
- 2) Mukai, T. Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka and M. Makino.

46th US- Japan conference on tuberculosis and leprosy. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. 7-9, December, 2011, Saitama, Japan.

- 3) 向井 徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第 84 回日本ハンセン病学会総会. 2011 年 5 月 岡山

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