

ルに、1ヶ月後にHVJ-エンベロップ/15K Granulysin DNAワクチンを治療投与 (i.m) した。その結果、

(a)長期間 (1年間) における生存率の改善効果をコントロール群に比較して認めた。すなわち1年後 (365日後) の生存率はGranulysin DNAワクチン投与群では25%であったが、コントロール群では0% (全頭死亡) であった。

Granulysin DNAワクチン治療カニクイザルは末梢血T細胞の結核菌抗原に対する増殖反応を増強した。

(b)さらに、血沈の改善効果や体重増加作用を発揮した。：すなわち、15K Granulysin DNAワクチン投与群はコントロールの生食投与群に比較して、血沈の改善が長期にわたり認められた。

(c)histopathology:15K Granulysin DNAワクチンはカニクイザルの実験モデルにおいて、肺のhistopathologyにおいてヒトと同様のgranulomaの形成が強く認められた。granuloma形成が強い群は著明な生存の延長が認められた。

(6) タイにおける結核患者のgranulysin : タイ国マヒドン大学との共同研究で結核患者の血清中Granulysinは健常人に比較して低下、特にrelapsed TB患者で低いことを明らかにした。

(7) リコンビナントKsp37蛋白を作製し、Ksp37はマウスの系でin vitroキラーT細胞の分化を誘導した。Granulysinと分化相乗効果を発揮した。Granulysin DNAワクチンとKsp 37 DNAワクチンはin vivoキラーT細胞分化相乗効果を示した。

D. 考察

(1) カニクイザルにおけるHVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの皮内投与の方が筋肉内投与よりも強力な結核治療効果を発揮した理由の一つとして皮内にはdendritic cellが多く存在し、このワクチンによって活性化されたことが考えられる。

(2) 15K Granulysin ワクチンや

HSP65+IL-12DNAワクチンはヒトの結核感染に最も類似のカニクイザルモデルを用い、強力な結核治療ワクチン効果を示した。したがって、これらの治療法はアジア諸国 (タイ・インド・フィリピン等) で大きな問題となっているMDR-TBやXDR-TBに対する治療に有用である可能性が強い。

(3) 15K Granulysinは、キラーTの分化誘導を介して結核免疫を増強し、結核治療ワクチン効果を発揮することが示された。したがってこの15K Granulysinに対するレセプターがT細胞上に存在することが考えられ、このレセプターに対する解析をヒト・キラーT細胞株を樹立したことにより、two-hybrid法を用い、共同研究で行いつつある。

E. 結論

(1) カニクイザルにおけるHVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンの皮内ワクチンと筋肉内投与による結核治療効果を比較した。皮内ワクチン投与の方が筋肉内ワクチン投与よりも有効であることが、血沈の改善や生存率で示唆された。

(2) 15K Granulysin DNAワクチンはカニクイザルの実験モデルにおいて、肺のhistopathologyにおいてヒトと同様のgranulomaの形成が強く認められた。granuloma形成が強い群は著明な生存の延長が認められた。

(3) HSP65+IL-12DNAワクチンはINHと相乗的治療効果を示した。マウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンとINHの併用治療群は肺の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。

(4) Granulysinレセプターの解析を、ヒト・キラーT細胞株を樹立して、酵母two-hybrid法で行いつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada, M., Y. Kita, T. Nakajima, S. Hashimoto, H. Nakatani, S.

- Nishimatsu, Y. Nishida, N. Kanamaru, Y. Kaneda, Y. Takamori, D. McMurray, E. V. Tan, M. L. Cang, P. Saunderson, and E. C. Dela Cruz. The study of novel DNA vaccines against tuberculosis. Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. Human Vaccines and Immunotherapeutics, in press.
- 2) Kita, Y., S. Hashimoto, T. Nakajima, H. Nakatani, S. Nishimatsu, Y. Nishida, N. Kanamaru, Y. Kaneda, Y. Takamori, D. McMurray, E. V. Tan, M. L. Cang, P. Saunderson, E. C. Dela Cruz, and M. Okada. Novel therapeutic vaccines [(HSP65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. Human Vaccines and Immunotherapeutics, in press.
2. 学会発表
- 1) 岡田全司. 新しい結核予防・治療ワクチンの開発と T 細胞免疫研究 (今村賞受賞講演). 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 2) 高森靖, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 高見泰子, 仲谷均, 岸上知恵, 西松志保, 名倉香織, 岡田全司. 新しい結核治療ワクチンの開発 (Transgenic マウス、SCID-PBL/hu マウスと DBA/1 マウスを用いた). 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012 年 4 月 神戸
- 3) 喜多洋子, 金丸典子, 林清二, 岡田全司. 結核に対する新しい治療ワクチン開発と免疫機構解析. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島
- 4) Okada, M. The study of novel vaccines against tuberculosis and differentiation of CTL using monkeys and mice. WCVII 2012 (EIGHTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 5-7 June, 2012, Barcelona, Spain.
- 5) Kita, Y., and M. Okada. Novel therapeutic vaccines [(Hsp65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic efficacy with chemotherapy. WCVII 2012 (EIGHTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 5-7 June, 2012, Barcelona, Spain.
- 6) Kanamaru, N., Y. Kita, N. Kobayashi, T. Kirikae, T. Hattori, A. Shimouchi, S. Kato, K. Tsuyuguchi, and M. Okada. Study of very infectious (super-spreader) multi-drug resistant tuberculosis in Japan and Asia. The 43rd Union World Conference on Lung Health (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 13-17 November, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.
- 7) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, S. Nishimatsu, T. Nakajima, Y. Kaneda, P. Saunderson, and E. V. Tan. Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy using chemotherapy. The 43rd Union World Conference on Lung Health (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 13-17 November, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.
- 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24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・副学長)

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.

Mycobacterium tuberculosis (結核菌)は細胞内寄生性細菌であり、貪食したマクロファージ内で増殖することができる。結核菌の細胞内増殖能は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獲得している。結核菌感染マクロファージにおけるファゴリソソーム形成阻害過程の詳細は明らかになりつつある。近年、結核菌の細胞内増殖能を制御する宿主因子としてオートファジーが関与していることが明らかになっている。マクロファージにおける結核菌へのファゴリソソーム形成阻害過程やオートファジー誘導機構に関してよく研究されているが、樹状細胞における結核菌ファゴソームの小胞輸送機構に関する知見はほとんどない。本研究において、樹状細胞に感染した結核菌へのオートファゴソーム形成機構についてイメージ解析によって明らかにした。

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。我々はこれまでに、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 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、Coronin-1a 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。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。結核菌感染マクロファージにおけるオートファジー誘導もよく研究されている。わまた、我々も、結核菌ファゴリソソーム形成を阻害する Coronin-1a はオートファゴソーム形成の阻害にも関与して、結核菌の細胞内増殖を支持していることを示した。このように、結核菌感染マクロファージにおける小胞輸送機構はよく研究されているが、結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構を含む、小胞輸送機構に関して、ほとんど知見はない。本研究では結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構をイメージ解析によって明らかにした。

B. 研究方法

1. 樹状細胞株

樹状細胞株として、DC2.4 と JAWSII を用いて実験を行った。また、骨髄由来樹状細胞は骨髄細胞を GM-CSF で分化させることによって得た。

2. 蛍光顕微鏡法

結核菌 Erdman 株を感染させた樹状細胞をパラフォルムアルデヒドで固定した後、抗 LC3 抗体、抗 p62 抗体、抗ユビキチン抗体など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. 遺伝子ノックダウン

樹状細胞の遺伝子ノックダウン実験は siRNA をトランスフェクションすることによって行った。

C. 研究結果

1. 樹状細胞に感染した結核菌にオートファゴソーム形成が行われる

樹状細胞株 DC2.4 および JAWSII に結核菌を感染させると、感染 2 時間後は結核菌ファゴソームにはオートファゴソームマーカータンパク質である LC3 は局在しなかったが (約 10%)、感染 6 時間後には約 30% の結核菌ファゴソームに局在した。また、感染 24 時間後においても結核菌ファゴソームに LC3 が局在していた。電子顕微鏡によって結核菌感染樹状細胞の薄片切片を観察した結果、感染結核菌はオートファゴソーム形成が行われていることが明らかになった。また、骨髄由来樹状細胞に結核菌を感染させても、感染 96 時間後において、結核菌ファゴソームの約 10% に LC3 が局在することが明らかになった。

2. 樹状細胞結核菌ファゴソームには p62 が局在する

樹状細胞に局在するオートファジー関連タンパク質の局在を調べた。オートファジーアダプタータンパク質である p62 は LC3 局在結核菌ファゴソームに共局在した。また、LC3 もしくは p62 局在結核菌ファゴソームはポリユビキチン化されることが明らかになった。

次に、リソソームマーカータンパク質である LAMP1 と MHC クラス II 分子の局在を調べ

た。感染 6 時間後では LAMP1 も MHC クラス II 分子は p62 局在オートファゴソームには局在していなかったが、感染 24 時間後には LAMP1 局在、もしくは MHC クラス II 分子局在オートファゴソームは増加していた。以上の結果は、結核菌オートファゴソームの成熟によってオートファゴリソソーム形成が起こること、および、結核菌抗原の抗原提示がオートファゴソーム形成によって促進されることを示唆する。

3. p62 依存的に結核菌ファゴソームはポリユビキチン化される

結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構を明らかにするため、結核菌感染樹状細胞をオートファジー誘導阻害剤である 3-メチルアデニンで処理した。LC3 局在結核菌ファゴソームは減少したが、p62 局在もしくはポリユビキチン化された結核菌ファゴソームは減少しなかった。また、オートファジー関連遺伝子である Atg5 や Beclin1 ノックダウン樹状細胞においても、p62 局在もしくはポリユビキチン化された結核菌ファゴソームは減少しなかった。次に、p62 をノックダウンした結果、ポリユビキチン化された結核菌ファゴソーム数は減少した。以上の結果は、結核菌ファゴソームのポリユビキチン化は p62 依存的に起こることを示す。

D. 考察

これまでの研究では、結核菌感染マクロファージにおけるファゴリソソーム形成阻害機構やオートファゴソーム形成機構について研究されてきた。しかし、結核菌感染樹状細胞における小胞輸送機構についての知見はほとんどなかった。本研究において、はじめて結核菌感染樹状細胞におけるオートファゴソーム形成機構について明らかになった。また、MHC クラス II 分子が局在する結核菌オートファゴソームが増加することは、オートファゴソーム成熟によって抗原提示が促進される可能性を示唆する。

結核菌はファゴリソソーム形成を阻害するため、樹状細胞による感染結核菌の抗原提示能は非常に低いといわれている。しか

し、生体内では結核菌感染によって非常に強力な感作 T 細胞が形成されていることがツベルクリン反応やクオンティフェロン検査などによって示されている。これまでは、この「矛盾」はクロスプレゼンテーションによる抗原提示機構によって説明されてきた。本研究は、結核菌感染樹状細胞での p62 依存的オートファゴソーム形成による抗原提示機構が、この「矛盾」を説明できる可能性を示唆する。本研究成果は、樹状細胞における結核菌オートファゴソーム形成機構と抗原提示能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、診断検査法の開発に貢献する可能性を示す。

E. 結論

結核菌感染樹状細胞ではオートファジーアダプタータンパク質 p62 依存的にオートファゴソーム形成が行われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Coronin-1a inhibits

autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cellular. Microbiol.*, 14: 710-727.

- 2) Seto, S., K. Tsujimura, and Y. Koide. 2012. Mycobacterial survival in macrophages in the lung as a result of Coronin-1a inhibition of autophagosome formation. *In* AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection Hyatt MA. edited. in press.

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24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.

近年、結核患者から分離される結核菌株の遺伝多型を分析し、それを手掛かりにして感染経路を推定する「結核分子疫学」が注目されている。菌株の異同判定には反復配列多型 (variable number of tandem repeats, VNTR) 解析が用いられているが、本手法は菌株間の近似性や系統関係を正確に把握することが難しく、広域的な分子疫学、定着要因の究明といった体系的な課題に対しては代替的もしくは補完的な分析法が求められる状況となっている。本研究課題では、臨床分離株のゲノム情報から見いだされた菌株の固有変異を遺伝マーカーとして活用して精度の高い系統分類と相同性解析を実現することにより、いわゆる「結核ゲノム疫学」を確立することを目指している。今年度は、我が国において広範に分離される VNTR 型別群である「Branch 2 (B2)」に着目し、ゲノム比較から見いだされた変異情報に基づく系統分類を試みた。B2 株を分類しうる SNPs として、IGSNP042, IGSNP068 を選んで G5/6 株 (146 株) における変異を調べたところ、B2 株と判定された株はすべて IGSNP042 変異型、逆に非 B2 株はすべて IGSNP042 野生型であった。一方、IGSNP068 の変異は野生型が 25 株、変異型が 33 株であり、B2 祖先株出現後に分岐し、いずれの系統も拡散、定着を達成したことが推察された。さらに、B2 に属する広域伝搬株 (4 株) の共通変異を分析すると、18 株が同一の変異を共有していることが確認され、これらの菌株との高い相同性が示唆された。こうした系統分類と VNTR 型別の相同性には相関性が見いだされず、ゲノム比較情報に基づく正確な系統分類情報が VNTR 型別の高解像度を補完する上で重要な役割を果たしうると考えられる。

A. 研究目的

結核患者から分離される結核菌株には遺伝子レベルでの個性、すなわち遺伝多型が存在し、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、そのような菌株の違いを手掛かりにして感染経路を推定する「結核分子疫学」が注目されている。結核分子疫学は 1990 年代に欧米で先駆的に導入された後、我が国においても手法の最適化が進められた。2011 年 5 月に一部改正された「結核に関する特定感染症予防指針」(厚労省)には、遺伝子型別を活用した分子疫学的サーベイランスの構築や研究

推進の必要性が明記され、各自治体、地方衛生研究所(地衛研)を中心に普及展開の機運が高まっている。

我が国では、12 領域からなる反復配列多型 (variable number of tandem repeats, VNTR) 解析、すなわち Japan anti-tuberculosis association (JATA) (12)-VNTR (Murase et al., J Med Microbiol. 2008) が国内標準法として確立しつつある。JATA (12)-VNTR は東アジア全域で優先する「北京型ファミリー」において高い型別分解能を示すとされており、我が国における結核分子疫学の実用化のために考案された

ものである。加えて、VNTR 型別では分析対象領域を追加することによってさらに高い型別分解能を実現できるという利点もあり、菌株の異同判定において強力な手法となっている。一方、本手法で得られる型別情報では菌株間の近似性や系統関係を正確に把握することが難しく、サーベイランス(不特定多数の結核菌株を対象とした型別分析)や広域間比較、未知の定着要因の究明といった体系的な研究目的においては、代替的もしくは補完的な菌株分析法が求められる状況になっている。

Branch 2 (B2) と名付けられた型別グループは、我が国の菌株分離傾向の中において、VNTR 型別による近似性が高い菌株群として顕著である。これらは北京型ファミリーの G5/6 亜系統群に属するが、北京型株には例外的な VNTR 型別を呈している。アジア地域全域において広範に分布が見られる G5/6 群(中国(上海周辺) 29.5%, 韓国 9.4%, タイ 17.2%など)の中で、B2 様 VNTR 型別を示す菌株は本邦に限局的である。Millet らの型別報告 (J. Clin. Microbiol. 2007) によると沖縄県での臨床分離株では検出例が少なく、Kang らの報告 (J Med Microbiol. 2010) では、韓国でも 80 株の分析中わずか 1 株のみの分離に留まっている。一方、本州地域での分析では非常に近似した VNTR 型別株が B2 株として一定頻度(北京型結核菌のうち 10~20% : Wada et al., FEMS Microbiol. Lett. 2009; Maeda et al., Int J. Tuberc. Lung Dis. 2010; Yokoyama et al., Infect. Genet. Evol. 2012; 瀬戸ら., 投稿中) で分離されることが明らかとなっている。また、追加 VNTR 領域を解析した場合においても同一パターンを呈する株が自治体枠を超えて断続的に分離されており(和田, 長谷., 結核. 2010), こうした背景には B2 の祖先株がかつて本州部において広く蔓延し、定着に至った可能性が示唆される。

本研究では、B2 株間における菌株の相同性を正確に把握し、VNTR 型別では分析できない菌株関係を理解することを目的として、結核菌ゲノム比較に基づく遺伝マーカーの

抽出と、それに基づく系統分類を試みた。

B. 研究方法

分析対象 東北~関西計 5 都府県(6 自治体)で分離された結核菌株 1,158 株(各地域あたり 76~451 株)において実施された JATA(12)-VNTR 型別データを分析対象とした。このうち、関西 3 地域において分離された G5/6 群株(B2 群特異的 VNTR パターンを呈する 58 株を含んだ 146 株)については、VNTR 型別に加えて、後述の SNP 型別に基づく系統分析を行った。

遺伝型別解析 JATA(12)-VNTR は、各自治体の地衛研において実施されたものである。12 領域の反復数は各 PCR 産物を DNA シーケンサー、マイクロチップ電気泳動、アガロースゲル電気泳動のいずれかの分析結果から算出された。各 VNTR パターンから、B2 株はその反復数の特徴(J11 = 2, J12 = 5 など)および Minimum spanning tree (MST) クラスタ解析(Bionumerics ver. 4.2)によって形成された樹形に基づいて抽出された。MST 解析は既報にしたがって実施した(Wada & Iwamoto., Infect. Genet. Evol. 2009)。

北京株の亜系統群分類(G5/6 群の決定)には、Filliol ら(J Bacteriol., 2006)の北京株分類 10 SNPs もしくは Wada ら(Infect Genet Evol., 2012)による modified 10 SNPs を分析して行った。

ゲノム情報 これまでに 3 府県から分離された B2 株(5 株)について、Genome Analyzer IIx (Illumina)によってフルゲノム DNA からの配列情報を取得している。これらのデータに対して、H37Rv ゲノム配列(AL123456.2)をレファレンスとして Burrows-Wheeler Aligner (BWA) ver. 0.5.8c を用いてマッピングし、データファイル(bam)を得た。各 bam ファイルから、Genome Traveler ver. 1.2 を用いて固有の点変異情報(SNPs)を抽出した。得られた変異情報からマッピング精度が低い重複遺伝子群(PE/PPE 遺伝子など)を除去し、より信頼性の高い変異情報を選択した。

株固有 SNPs による系統分類 G5/6 群に

属する菌株 (146 株) の SNP 解析は、各ポジションを含んだ領域について PCR プライマーをデザインした。高 GC 比への増幅効率を高めるために TaKaRa GC1 buffer を用いて PCR を実施した。得られた増幅産物に対してサンガー法での塩基配列解析を行い、当該変異の有無を確認した。

倫理面への配慮 本研究に供試された結核菌株およびその遺伝型別は、共同研究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、個人情報の特典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とその遺伝型別の利用は、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

B2 様 VNTR 型別株の分布。東北 2 自治体 (389 株)、首都圏 1 自治体 (144 株)、関西圏 3 自治体 (625 株) の JATA(12)-VNTR 型別を集積し、型別および MST 樹形に基づいて B2 株を抽出した。結果、各株集団ともに一定頻度の検出が確認され、B2 株が高い近似性を維持しながら全国的に拡散していることが示された。

SNP による分類。関西圏由来株 (625 株) のうち、北京型 G5/6 群に属する菌株は 146 株 (23.4%) であった。これらの VNTR 型別特性から、B2 株は 58 株 (全体の 9.3%, G5/6 群の 39.7%) を占めていることが確認された。

B2 株 (株名: 4994) の比較ゲノム解析およびその固有変異を遺伝マーカーとした分析から、本邦由来株は G5/6 群は 4 つの遺伝集団に細分類されることが明らかになっている (図 1; Wada et al., *Infect. Genet. Evol.* 2012 から改変)。

これらを分類しうる SNPs として、IGSNP042, IGSNP068 を選んで G5/6 株 (146 株) における変異を調べたところ、B2 株と判定された株はすべて IGSNP042 変異型、逆

に非 B2 株はすべて IGSNP042 野生型であった。一方、IGSNP068 では野生型が 25 株、変異型が 33 株であり、B2 の祖先株が出現後、分岐して定着したことが推察される。

次世代シーケンサーによる分析を終えている B2 株は 4994 を除いて 4 株にのぼる。それらは「広域拡大性クラスター型」として地域・期間に関わらず分離される VNTR 型として選択されたものである。これらの株はすべて IGS068 変異型であり、加えてゲノム上に 11 箇所の変異 (10 SNPs および Rv3829c に生じた 34 bp の挿入変異) を共有するクローン性の高い菌株群であった (図 2)。B2 株 (58 株) についてこれらの共有変異の有無を調べたところ、全 11 箇所を共有する株が 18 株見いだされ、B2 株の約 3 割を占めていることが明らかとなった。

VNTR 型別との対応。G5/6 群に属する 146 株について、JATA(12)-VNTR 型別に基づく MST 樹形に SNP 解析結果を投影した (図 3)。前述したとおり、非 B2 株/B2 株は IGSNP042 によって明瞭に分類しうる一方で、B2 グループでは VNTR 型別にかかわらず 3 種類の系統に分かれることが見いだされた。

D. 考察

本課題は、次世代シーケンサーによる菌株ゲノム情報を利用して、結核菌の拡散機序と伝搬経路の推定をより正確なものとする試みである。結核菌のゲノム構造は安定性が高いため、ゲノム全領域にわたって蓄積されるほとんどの変異情報が菌株間の同一性、系統関係を正確に反映しうる。このような性質はゲノム情報を直接的に分子疫学的解釈に用いることを可能とする上で極めて重要である。

結核菌は空気感染による伝搬を起こすことから、その経路を断定することは難しい。しかしながら、高い発症率によって平面的に感染が広がるウイルス性疾患等とは異なり、伝搬経路をより正しく推定することが公衆衛生の現場に直接フィードバックされ、接触者健診などのアクションに繋がる。高レベルな公衆衛生・医療水準の中にあつて、依然として結核患者の発生が続いている日

本の状況は世界的にも特殊である。一方、現代の高蔓延国においても、将来的に罹患率が低下することが予想されている。そのような状況の下、現代日本をモデルとした結核分子疫学の向上は「次世代の結核対策」として波及しうるものである。とりわけ、我が国と同じく北京型ファミリーが優先するアジア諸国においては、そのノウハウは極めて有用なものになりうるだろう。

本課題では、我が国において特異的に分離され、かつ VNTR 型別上においても特徴的なパターンを呈する B2 株に着目し、ゲノム比較から見いだされた変異情報に基づいた細分類を行った。その中で、VNTR 型別では捉えきれない菌株間の相同性が浮かび上がり（図 3）、ゲノム比較に基づく正確な系統分類情報が VNTR 型別の高解像度を補完する上で重要な役割を果たしうると考えられた。

これまで先行研究などにより、関西地域由来株を中心とした臨床分離株のゲノム情報が数十株蓄積されている。今後それらのデータを基に、同等のプロセスを経て菌株間の相同性解析を実施することにより、本邦において分離される結核菌株の遺伝学的状況が精密に記述可能である。そうした展開は分子疫学、公衆衛生の領域において先鋭的であると言える。

E. 結論

本研究は、ゲノム情報から見いだされた臨床分離株の固有変異を遺伝マーカーとして活用し、現行法である VNTR 型別法の高解像度を補完することで、より体系的な研究展開を目指すものである。本年度は、B2 株における比較ゲノム情報による菌株分類によって、VNTR 型別では見出し得なかった菌

株間の相同性を把握する上で有用な知見を与えることが確認された。今後、他の菌株群で同様のプロセスを進めることにより、臨床分離株の全体的な遺伝学的状況が精密に把握され、公衆衛生領域に留まらない研究展開へと結びつくことが期待される。また、ゲノミクスに基づく分子疫学的手法は現代の途上国、結核高蔓延国における一モデルとして波及しうるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada, T., T. Iwamoto, A. Hase, and S. Maeda. 2012. Scanning of genetic diversity of evolutionarily sequential *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains based on genome wide analysis. *Infect. Genet. Evol.*, 12: 1392–1396.

2. 学会発表

- 1) 和田崇之, 岩本朋忠, 長谷篤, 前田伸司. ゲノム比較に基づく結核菌臨床分離株の遺伝的多様性包囲網の構築. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 長崎.
- 2) 横山栄二, 蜂巢友嗣, 岸田一則, 岩本朋忠, 中西典子, 有川健太郎, 和田崇之, 長谷篤, 瀬戸順次, 阿彦忠之. 集団遺伝学的解析による北京型結核菌の地域間比較. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島市

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

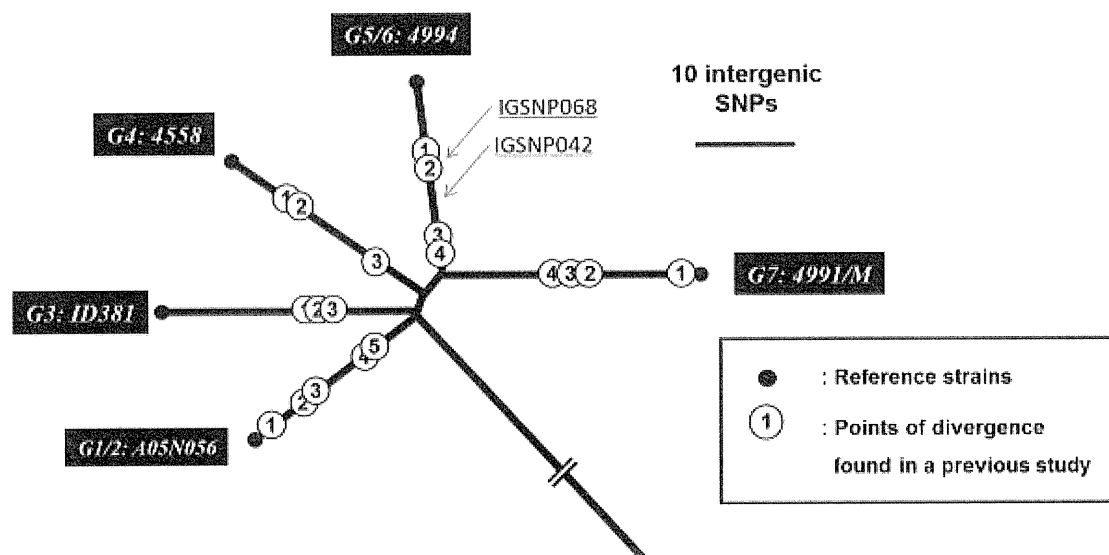


図1. 北京型ファミリーの代表株を用いたゲノム比較 (5 株) に基づいて作成された本邦由来北京型結核菌の系統分岐図. G5/6 群は 4 群に細分類され, IGSNP042 および IGSNP068 はそれぞれ異なる分岐点を支持する変異である.

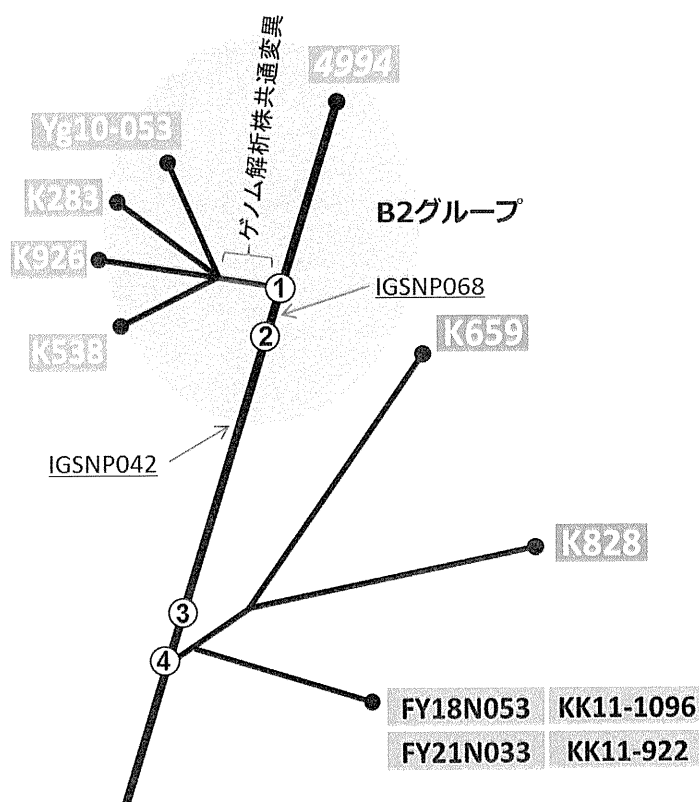


図2. G5/6 群におけるゲノム比較株 (計 11 株) の系統関係. 国内分離株では現在 11 株が分析済みであり, このうち 5 株が B2 様 VNTR 型別を呈している. 広域拡大性クラスター型を示す 4 株には 11 か所の共有変異と分岐後の固有変異が見出されている.

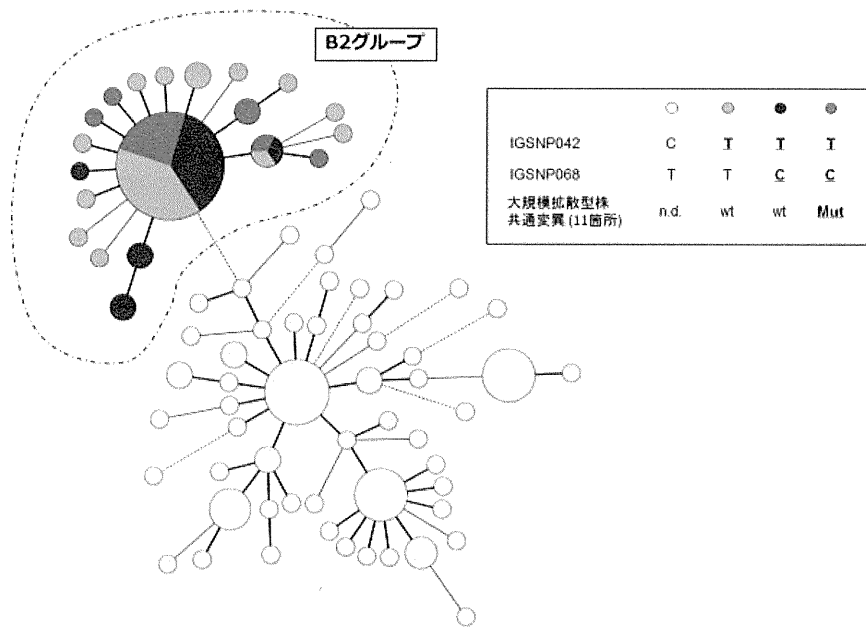


図 3. G5/6 群に属する菌株 (146 株) の JATA(12)-VNTR 型別に基づく MST 樹形と SNP 分類. 円は各 VNTR 型別に対応し, そのサイズは菌株数を表わしている. B2 グループは VNTR 型別の相同性から樹形上で単一の集団を形成するが, より精度の高い SNP 分類ではモザイク状の内部構造が浮かび上がる.

平成24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）
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、代謝栄養指標に注目して検討を進めてきた。本年度は、ベトナムの医療機関との国際共同研究の中で、特に治療中の多剤耐性結核患者 58 名について、adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4 の血中濃度を測定するとともに、血液細胞中の免疫関連遺伝子(Th1 系、Th2 系、エフェクター分子など)の発現量との相関について検討した。その結果、adiponectin 濃度と IL12RB2、IL2、IL12A は Spearman の順位相関係数で、-0.3 から-0.4 程度の中等度の負の相関を示した（非補正 P 値 0.05 から 0.004）。すなわち、adiponectin の高値は、Th1 系サイトカインとそのレセプターの発現減弱と関連していた。adiponectin の高値は、body mass index など、その他の栄養指標と独立に結核の重症化と関連するという報告もあり、結核と脂質関連指標との密接な関連を示したものと解釈できる。途上国では、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、これら栄養代謝指標を用いた慢性感染症へのアプローチは有用と思われる。

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。

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免疫、感染症の関係

についての研究は、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な情報をもたらすものと期待される。

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、遺伝素因、基礎疾患、合併症、使用薬剤、代謝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、活動性結核患者の血液中に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クスの手法により複数個同定してきたが、それらの主要タンパクは脂質代謝マーカーであり、脂肪細胞や肝細胞から分泌され、栄養代謝に関連し、免疫、炎症との関連が示唆された 1)。そこ

で今回ベトナムのホーチミン市において治療中の多剤耐性結核患者について4種類の脂質代謝マーカーと末梢血細胞中の免疫関連遺伝子の発現量との相関について検討した。

B. 研究方法

ベトナム南部のホーチミン市にあるファムゴックタック病院はベトナム南部の結核対策の要であり、最大の結核病院であり、以前より我々は共同研究を実施している。今回、多剤耐性結核に関連する宿主要因の特徴を明らかにするための臨床研究の一部として本研究は実施された。

臨床研究自体のエントリー基準は、薬剤感受性試験で多剤耐性結核 (INH, RFP 耐性) と診断された16歳以上70歳までの患者で、18か月の治療、観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとした。HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。

実際には、外来通院中の多剤耐性結核患者58名から研究参加の同意を得て、治療開始後3-6か月後に血液サンプルを収集し、全血にRNA安定化剤を付加して凍結し、当施設に転送してRNAを抽出後、免疫関連分子 (IL12RB2, IL2, IL12A, IL23A, PRF1, LTA, GNLY, IL18, TNF, IL12RB1, TGFB1, GZMB, IFNG, IL15, IL4, CXCL10, IL4d2, IFNGR1, SPP1, IL10, IFNGR2) について、定量的RT-PCR解析を行なった。同時にEDTA添加血より血漿を回収し、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)。

それ以外に臨床疫学的データ (年齢、性別、body mass index [BMI]、末梢血リンパ球数など) 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血液中のタンパクおよび遺伝子発現解析研究であり、ヒトゲノムを扱う研究ではないが、本研究とは直

接関連しない部分には、包括的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」を遵守して、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施している。

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ファムゴックタック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ている。

統計解析は、JMP 8.0.2 (SAS institute JAPAN) パッケージにより、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. 多剤耐性結核における血漿中CRP、adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4の血中濃度の測定

以前のわれわれの検討により、結核未感染健康者 (N=29) の性別年齢調整平均値はCRP ($\mu\text{g/ml}$) 1.12 [0.60-2.08], adiponectin ($\mu\text{g/ml}$) 7.19 [5.67-9.11], leptin (ng/ml) 4.50 [3.34-6.05], fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$) 234.22 [212.40-258.29], RBP4 39.64 [32.28-48.69]であった2)。これに対して、今回対象となった多剤耐性結核患者 (N=58) は、男性43名、女性15名で、中央値39.5歳 [28.8-48.3]の性別年齢分布を示した。血漿中の各指標の平均値はCRP ($\mu\text{g/ml}$) 11.00 ± 18.36 , adiponectin ($\mu\text{g/ml}$) 12.06 ± 6.67 , leptin (ng/ml) 2.98 ± 3.36 , fetuin-A ($\mu\text{g/ml}$) 187.08 ± 47.67 , RBP4 27.61 ± 11.02 であり、

CRP の明らかな高値、adiponectin の高値、leptin, fetuin-A, RBP4 低値傾向を認めた。健常者との比較については、昨年度、活動性結核の治療前後の推移を報告しているが、多剤耐性結核においてもほぼ同様の傾向を示した。

2. 多剤耐性結核における血漿中脂質代謝マーカーと BMI の相関。

図 1 に示すように、adiponectin 値は BMI と明らかな負の相関、leptin 値は BMI と正の相関を示した。

3. 多剤耐性結核における血漿中脂質代謝マーカーと全血中の免疫関連マーカーとの相関

血漿中脂質代謝マーカーは、単に栄養や脂肪量の指標ではなく、免疫炎症に深く関連することが報告されているため、血漿の採取と同時に全血中の血液細胞中の IL12RB2, IL2, IL12A, IL23A, PRF1, LTA, GNLY, IL18, TNF, IL12RB1, TGFB1, GZMB, IFNG, IL15, IL4, CXCL10, IL4d2, IFNGR1, SPP1, IL10, IFNGR2 の発現量を定量的 RT-PCR 解析によって測定し、adiponectin, leptin, fetuin-A, RBP4 値と比較した。それ以外にリンパ球数、CRP を同時に比較した。

その結果、adiponectin と leptin 値が逆相関を示すほか、adiponectin と IL12RB2、IL2、IL12A は、Spearman の順位相関係数で、-0.3 から -0.4 程度の中等度の負の相関を示した（非補正 P 値 0.05 から 0.004）。また fetuin-A と CXCL10 の負の相関も認められた（図 2）。

一方、leptin と IL2、fetuin-A と RBP4 の正の相関が認められた（図 3）。

4. 多剤耐性結核における BMI と全血中の免疫関連マーカーとの相関

脂質関連マーカーは、健常者で BMI との相関が知られており、多剤耐性結核でもその傾向が顕著であったことから、BMI と免疫関連マーカーの相関を検討したところ、図 4 に示すように IL2、IL12A と BMI は正の相関を示したが、IL12RB2 は、全く相関を示

さなかった ($rs=0.0692$, $P=0.6478$ 、表は省略)。

D. 考察

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と考えられる。

我々は、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、プロテオミクス的手法により、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、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報告してきた 1)。

これまでに、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おり、RBP4 も非炎症状態では、栄養状態、体脂肪の指標となるが、炎症状態では速やかに減少して、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であった。fetuin-A は、もともと体脂肪量より肝脂肪量を反映すると考えられたが、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示された 2)。

一方、adiponectin を含むこれらの脂質関連マーカーは、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、従来、過栄養の指標（血中 adiponectin 値は肥満関連疾患と逆相関）として利用されてきた。

本年度、これらの点についてさらに検討を進め、治療中の多剤耐性結核症における上記、脂質代謝マーカーと血液細胞中の免疫関連遺伝子の発現について検討した結果、初めに、多剤耐性結核患者の血液中でも、昨年度活動性結核で見られたと同様の脂質代謝マーカー値の高低を確認することができた。特に adiponectin と BMI の正の相関、leptin との負の相関は、予想された通りで

あった。また adiponectin と leptin の負の相関、fetuin-A と RBP4 の正の相関は今回の多剤耐性結核のパネルで強く確認された。

さらにこのような脂質代謝マーカーの値の高低が、血液細胞中の免疫関連遺伝子発現と相関するのかどうか検討したところ、特に adiponectin と Th1 系サイトカイン、レセプター群の発現との間で逆相関が認められた（ただし、多重比較を考慮すると有意差は失われる可能性があるので追試が必要である）。

今回、もっとも特徴的にみられた adiponectin とリンパ球機能の逆相関については、まず低栄養による二次的な adiponectin の高値、リンパ球数の低下、mRNA の低下に基づく可能性が考えられ、IL2 と IL12A と BMI の正の相関はそのような単純な低栄養に伴うリンパ球機能低下を反映しているかもしれないが、IL12RB2 と adiponectin の負の相関はそれだけでは説明がつかず、adiponectin 自体が抗原認識からリンパ球活性化に至る系を抑制する系、マクロファージの選択的活性化を介した系などを介する可能性についても考えるべきかもしれない。特に最近になり、脂質代謝関連マーカーとリンパ球応答に関する知見が蓄積されており、興味深い。

さらに、我々はこれまでに adiponectin 高値と leptin 低値が、結核の重症化（初診時のレントゲン上の広範囲の陰影を指標に）に関連しており、BMI と独立な危険因子として働いていることを報告しており、単純な低栄養という漠然としたものでなく、今後、脂質代謝関連マーカーと結核免疫とのより直接的な関連について、検討する必要があるものと思われる。

多剤耐性結核においては、免疫能を高めるなどの宿主側の感染防御能への介入が重要であり、将来的に本疾患の予防治療を考える上で重要な知見と思われた。

E. 結論

治療中のベトナム人多剤耐性結核患者 58 名について、adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4 の血中濃度を測定するとともに、血液

細胞中の免疫関連遺伝子(Th1 系、Th 2 系、エフェクター分子など)の発現量との相関について検討した。その結果、adiponectin の高値は、Th1 系サイトカインとそのレセプターの発現減弱と関連していた。結核と栄養代謝免疫指標の密接な関連を示したものと解釈できる。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、これらの栄養代謝免疫指標を用いたアプローチは有用と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hijikata, M., J. Shojima, I. Matsushita, K. Tokunaga, J. Ohashi, N. T. L. Hang, T. Horie, S. Sakurada, N. P. Hoang, P. H. Thuong, L. T. Lien, and N. Keicho. 2012. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum. Genet.*, 131: 675-682.
- 2) Keicho, N., I. Matsushita, T. Tanaka, T. Shimbo, N. T. Hang, S. Sakurada, N. Kobayashi, M. Hijikata, P. H. Thuong, and L. T. Lien. 2012. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One*, 7: e38703.
- 3) Sakurada, S., N. T. Hang, N. Ishizuka, E. Toyota, L. D. Hung, P. T. Chuc, L. T. Lien, P. H. Thuong, P. T. Bich, N. Keicho, and N. Kobayashi. 2012. Inter-rater agreement in the assessment of abnormal chest X-ray findings for tuberculosis between two Asian countries. *BMC Infect. Dis.*, 12: 31.

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

Nonparametric: Spearman's ρ			
Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
AdipoN_log	BMI	-0.5821	<.0001*
Leptin_log	BMI	0.6191	<.0001*
CRP_log	BMI	-0.2829	0.0346*
Fetuin_log	BMI	0.111	0.4152
RBP4_log	BMI	0.2005	0.1384
BMI	ly_no	-0.0251	0.8542

図1 血漿中adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4のBMIとの相関(脂質代謝マーカー濃度は対数変換してある)

Nonparametric: Spearman's ρ			
Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
IL12RB2	AdipoN_log	-0.4116	0.0037*
IL2	AdipoN_log	-0.3993	0.0049*
Leptin_log	AdipoN_log	-0.3412	0.0088*
CXCL10	Fetuin_log	-0.3346	0.0201*
IL12A	AdipoN_log	-0.2858	0.0490*
LTA	CRP_log	-0.2792	0.0546
IL23A	AdipoN_log	-0.2771	0.0566
IL18	ly_no	-0.2696	0.0639
LTA	AdipoN_log	-0.2663	0.0674
IL15	Fetuin_log	-0.265	0.0688

図2 血漿中adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4の血液細胞中の免疫関連遺伝子の発現量、リンパ球数、CRPとの相関(脂質代謝マーカー濃度は対数変換してある。負の相関の強い上位10セットを表示した。うちP値<0.05は上位5セットに見られた)

Nonparametric: Spearman's ρ			
Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
IL2	Leptin_log	0.3789	0.0079*
RBP4_log	Fetuin_log	0.3294	0.0116*
IL10	ly_no	0.3085	0.0329*
LTA	ly_no	0.3081	0.0331*
IL12RB1	ly_no	0.2923	0.0438*
IFNGR1	CRP_log	0.2709	0.0626
TGFB1	ly_no	0.2684	0.0651
IL12RB2	Fetuin_log	0.2603	0.0739
TNF	Leptin_log	0.2353	0.1074
IL12RB1	Fetuin_log	0.2334	0.1104

図3 血漿中adiponectin、leptin、fetuin-A、RBP4の血液細胞中の免疫関連遺伝子の発現量、リンパ球数、CRPとの相関(脂質代謝マーカー濃度は対数変換してある。正の相関の強い上位10セットを表示した。うちP値<0.05は上位5セットに見られた)

Nonparametric: Spearman's ρ			
Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ
IL2	BMI	0.3964	0.0064*
IL12A	BMI	0.3521	0.0164*
IL23A	BMI	0.2507	0.0928
TNF	BMI	0.2113	0.1586
IFNG	BMI	0.1944	0.1956

図4 BMIと免疫関連遺伝子の発現量との相関(正の相関の強い上位5セットを表示した。うちP値<0.05は上位2セットに見られた。有意な負の相関を示すセットは認められなかった)