

ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究

研究分担者 慶長 直人 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部長
土方美奈子 同ウイルス性呼吸器疾患研究室長
松下 育美 同研究員

研究要旨

ホーチミン市のファムゴックタック病院は、ベトナム南部の結核拠点病院である。多剤耐性結核についての共同研究として多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を検討すべく、断面研究を実施した。58名の多剤耐性結核患者について、抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 *MBL2* の検討を行った。炎症時においても *MBL2* の遺伝子型は、mannose binding lectin (MBL) の血中濃度を明確に規定しており、MBL の高発現型 (YA/YA)、中発現型 (YA/XA)、低発現型 (それ以外) に分けられた。高発現型の遺伝子型が多剤耐性結核群では健常者に比してやや低頻度に認められたが、検出力が低く有意差には至らなかった。さらに 27 種類のサイトカイン等の免疫系分子の血中濃度との関連を検討したところ、MBL とインターフェロン γ の血中濃度との間に有意な相関が認められた。また、インターロイキン 12 α 鎖 (p35) の遺伝子発現は MBL 値と逆相関にあった。MBL はヒトにおいて自然免疫の初期応答のみならず、Th1 応答にも影響を与えている可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国に居住している外国人のうち、アジア系の集団は 70%以上を占めることが知られている。このためアジア人の結核対策は外国人結核対策の主要部分を占める。さらに日本人の結核発症者の中で多剤耐性結核の占める割合は低い、アジアを含む発展途上国では、治療歴のない患者でも数%以上の頻度で多剤耐性結核が認められるのが通例であり、今後、外国人結核対策がわが国の多剤耐性結核対策の重要な部分を占めるようになるのではないかと懸念されている。

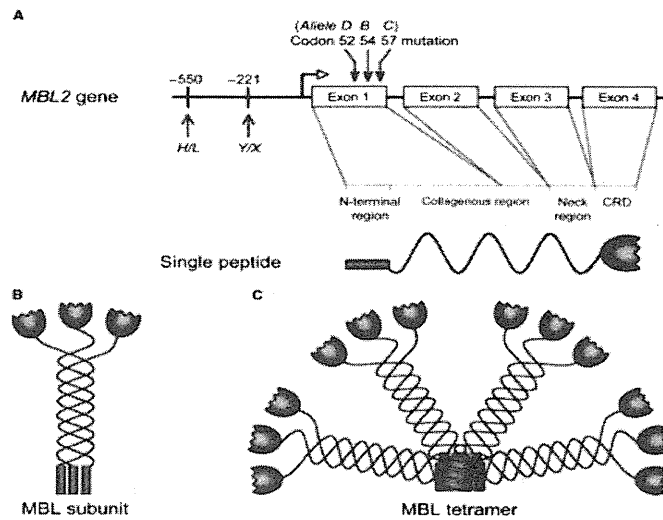
このような背景のもと、アジア人における発症増加が危惧される多剤耐性結核の発症要因を明らかにすることは、わが国を含むアジア地域全体の結核対策に貢献するものと期待される。

これまで我々は東南アジア諸国において結核に関する国際共同研究をおこなってきた。多剤耐性結核の発生は、不適切な治療により、結核菌ゲノムの中の薬剤効果に関連する遺伝子に変異が生じ、増殖することが最も重要なメカニズムとして提唱されており、結核医療

に関わる人為的要因や制度上の問題が一義的であるが、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能なども関与しているものと推測される。そこで、本研究ではベトナム人多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにすることを目的としている。

本年度解析対象とした mannose-binding lectin (MBL) は分泌型のパターン認識受容体であり、肝臓で合成されて血中に存在する。チューリップの花束と形容されるオリゴマーを形成し、セリンプロテアーゼ前駆体 (MASPs) と複合体を形成している (図 1)。微生物表面の糖鎖を認識して結合すると高次構造変化が起こり、プロテアーゼが活性化され、レクチン経路の補体活性化、オプソニン化-貪食、あるいは微生物の融解を引き起こす。MBL 遺伝子 (*MBL2*) に多型が存在することは古くから知られており、プロモーター領域の H/L, X/Y, P/Q 多型、エクソン 1 の非同義置換を伴う A/B,C,D 多型が認められるが、連鎖不平衡の存在によって存在するハプロタイプの種類は限定されており、アジア人集団ではコラーゲン構造が損なわれることにより本

図1. MBL遺伝子とタンパクの構造



Ip WK, et al. Immunol Rev. 2009;230(1):9-21.

図2. MBLハプロタイプの世界分布



MBL2 haplotype frequencies in different populations. Thye T, et al, 2011 Plos One

来のオリゴマー構造がとれなくなる B allele を持つ LYPB、プロモーター活性が低い X allele を持つ LXPA、の2つのハプロタイプが MBL 欠損/低発現型であり、他の HYPA, LYPA, LYQA は血中濃度も高い高発現型であるため、X/Y、A/B に注目すると、大きく YA/YA, YA/XA, その他の3群に分けられる。

結核と MBL の遺伝的多型の関連はこれまでしばしば報告されてきたが、MBL 欠損/低

発現型が結核に抵抗性であるという報告と、感受性であるという報告がともにあり、メタアナリシスでも結論が得られていない。そのメカニズムについても、MBL による菌の食細胞への接着が結核菌の排除に働くという考えと、細胞内寄生を促進するという考え方がある。

いずれにせよ、MBL2 は、自然免疫分子の中で機能欠損型多型が最も高頻度で見られる遺伝子と言われ (図2)、MBL 欠損は感染症

の選択圧と複雑に関連して世界に分布、拡散してきたものと推測される。

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、ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査を実施する結核レファランスセンターのうちベトナム南部の結核対策の責任病院である。耐性結核の宿主要因の候補遺伝子の特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにすることを目的として研究を実施している。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、HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。外来通院中の多剤耐性結核患者58名から血液サンプルを収集し、EDTA添加血より血漿（血中タンパク濃度測定用）および血球（ゲノムDNA抽出用）を得た。またRNA安定化剤を付加して凍結した全血より total RNA を抽出した。

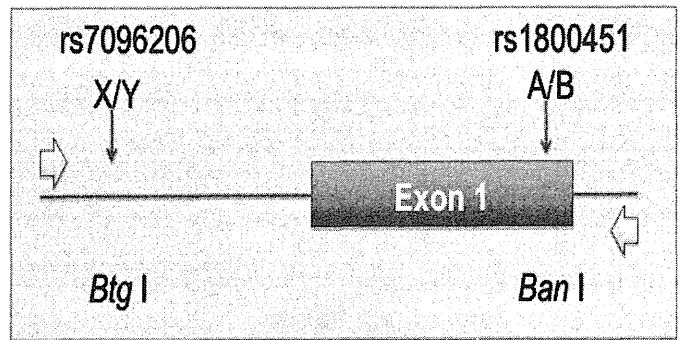
ベトナム人のH/L, X/Y, P/Q, A/B多型のハプロタイプ構造を確認した後、MBLの発現に関連するX/YとA/Bの2カ所の多型については、約600bpの領域をPCR増幅して、X/Yは*Btg*Iによる消化、A/Bは*Ban*Iによる消化によるPCR-RFLP法によって判定した（図3）。

MBLの血中濃度は、EDTA採血検体も正確に測定できる市販のELISAキット（Quantikine ELISA Human MBL R&D）によった。

血漿中のサイトカイン等、27種類のサイトカイン等の生理活性物質（IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF-a, VEGF）の濃度は蛍光ビーズアレイ（Bio-Plex サスペンションアレイシステム）を用いて同時スクリーニングを行なった。

全血より抽出したRNAを用い、免疫関連

図3. 方法



分子（IL12RB2, IL2, IL12A, IL23A, PRF1, LTA, GNLY, IL18, TNF, IL12RB1, TGFB1, GZMB, IFNG, IL15, IL4, CXCL10, IL4d2, IFNGR1, SPP1, IL10, IFNGR2）の mRNA 発現量を、TaqMan Gene Expression Assays を用いた定量的 RT-PCR 解析系にて測定した。

（倫理面への配慮）

実際の患者検体を用いたゲノム解析は、両国の指針（我が国では、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針）に準拠して、事前にプロトコールは、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

大規模なコホート研究は、本研究班の3年間の枠組みでは困難なため、断面研究に近い小規模な研究デザインとならざるを得なかった。本年度は特に菌の接着と深く関係するMBL2遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現、タンパク濃度に関する解析を試みた。

MBL2遺伝子は多型性に富み、遺伝子型により血中濃度が明確に規定されており、高発現型（YA/YA）、中発現型（YA/XA）、低発現型（それ以外）に分けられる。

MBLの高発現型と低発現型遺伝子型の比率をみると、MDRの例数が少ないので有意差は出ないが、高発現型（YA/YA）の遺伝子型頻度は、多剤耐性結核群では健常対照群に比べてやや低値を示した（データ省略）。

これまで遺伝子頻度と血中濃度の関連は主に健常者における検討がなされているが、

図4. MBL2 遺伝子型と多剤耐性結核治療中の血漿MBL濃度 (N=58)

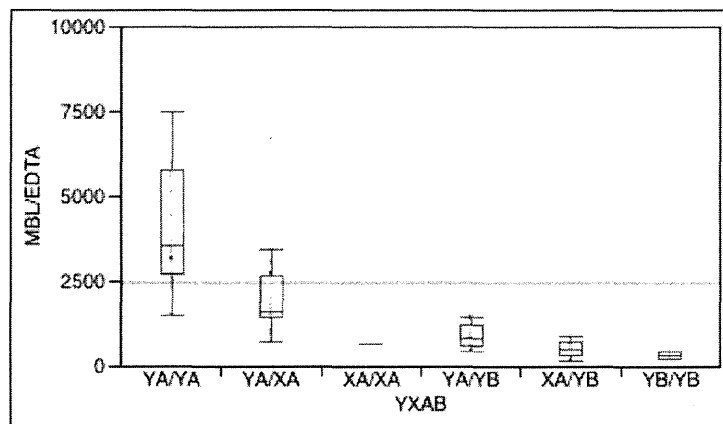
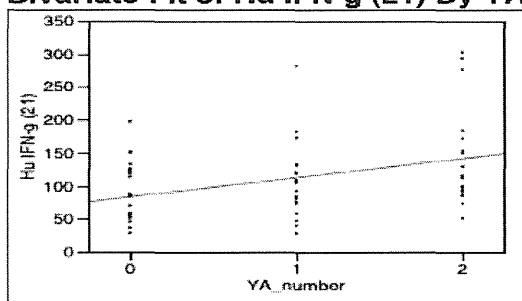


図5. インターフェロン-γ 濃度と、YA alleleの本数の関係

Bivariate Fit of Hu IFN-g (21) By YA_number



Linear Fit

Linear Fit

$$\text{Hu IFN-g (21)} = 83.402094 + 29.032655 * \text{YA_number}$$

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	83.402094	12.7769	6.53	<.0001*
YA number	29.032655	10.25085	2.83	0.0065*

MBLは急性期蛋白質であり、結核患者では健常者より血中 MBL 濃度が高いことが報告されている。今回の検討で治療中（治療開始 3～6 か月後）の患者群でも、MDR-TB の血漿中の MBL 濃度は YA/YA で高値、YA/XA では中程度、それ以外は低値を示すことが明らかになった（図 4）。

次に MBL の濃度が血中サイトカイン量と関連するかどうか蛍光ビーズアレイを用いて

スクリーニングしたところ、インターフェロン-γ（IFNG）濃度が最も確かな正の相関を示した（Spearman の相関係数=0.34, P=0.0099）。

MBL 血中濃度と IFNG 濃度の相関がみられたので、さらに MBL の YA アレル（野生型）の保有数との関係を調べたところ、YA の本数は IFNG 濃度と有意に相関していた（P=0.006；図 5）。

一方、全血中の免疫関連分子の遺伝子発現量と MBL 血中濃度の関連を検討したところ、インターロイキン 12 (IL12) の α 鎖 (p35) の遺伝子発現は血中 MBL 値と逆相関を示した (Spearman の相関係数 = -0.43, P=0.003)。

D. 考察

MBL 遺伝子多型は多剤耐性結核自体とは強い関連は示さなかったが、MBL 遺伝子多型は非炎症状態のみならず、結核治療中のような炎症状態でも血中濃度に強い影響を与えていた。同時に測定された患者の CRP 値などの炎症指標には大きなばらつきがあったが、MBL 血中濃度はむしろ宿主側要因により明確に規定されていることが明らかになった。また MBL はインターフェロングamma 血中濃度と正の相関を示し、IL12 α 鎖 (p35) 遺伝子発現と負の相関を示した。今後、より大規模な研究でこれらの結果を確認する必要がある。

自然免疫系の分子として知られる MBL 遺伝子多型が疾患における Th1 応答に関連することは、MBL が従来言われている菌のオプソニン化のみならず、宿主の Th1 応答とも緊密に関連していることを示唆するものである。

また別の Th1 系遺伝子である IL12 α 鎖 (p35) の mRNA 発現が MBL の高濃度と逆相関するという事は、すでに病変局所に動員されているのか、何らかの negative feedback メカニズムによって抑制されている、などが考えられた。

ベトナム人多剤耐性結核について、迅速に研究を実施することができたことは共同研究の長い歴史に基づく信頼関係によるものである。多剤耐性菌は、ベトナムにおいても最近、深刻な問題としてとらえられており、さらに両国に裨益する研究成果が期待される。

E. 結論

わが国の外国人登録者数はアジア人が全体の 70% 以上を占め、今後、日本人の結核罹患率の低下に伴い、相対的に重要度が増していくものと推測される。アジア人集団の多剤耐性結核発症に関する臨床疫学情報、宿主側の発症素因をとらえ、多剤耐性結核対策に貢献すべく研究を進めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

- Hijikata M, Shojima J, Matsushita I, Tokunaga K, Ohashi J, Hang NTL, Horie T, Sakurada S, Hoang NP, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Vietnamese. *Hum Genet* 131 (5): 675-682, 2012.
- Keicho N, Matsushita I, Tanaka T, Shimbo T, Hang NT, Sakurada S, Kobayashi N, Hijikata M, Thuong PH, Lien LT. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One* 7(6):e38703, 2012.
- Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 79(3):190-197, 2012.
- Sakurada S, Hang NT, Ishizuka N, Toyota E, Hung LD, Chuc PT, Lien LT, Thuong PH, Bich PT, Keicho N, Kobayashi N. Inter-rater agreement in the assessment of abnormal chest X-ray findings for tuberculosis between two Asian countries. *BMC Infect Dis* 12(1):31, 2012.
- Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A,

Tokunaga K, Keicho N. Association of SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms with pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) infection. Hum immunol 73 (5): 529-536, 2012.

2. 学会発表

1. Hijikata M, Hang NTL, Yen NTB, Hong NT, Sakurada S, Lan NN, Kobayashi N, Dung NH, Keicho N. Association between Immune Gene Expression Levels in the Whole Blood from Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis and Their Treatment Outcome. In: 第52回日本呼吸器学会総会, 4月20日-22日, 神戸, 2012.

HIV 合併結核の病態に関する研究

研究分担者 櫻田紳策 国立国際医療研究センター
呼吸器疾患研究部細菌性呼吸器疾患研究室 室長
国際医療協力局派遣協力課併任

研究要旨

①ベトナムのハノイ肺病院との連携研究を立ち上げ、ベトナムにおける HIV 合併結核の病態とグラニュリシンの関連についての臨床研究に先立ち、健常医療従事者を対象にした血漿グラニュリシン濃度と臨床疫学的要因との関連解析研究を実施した。②国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターにおける HIV 合併結核患者血漿・血清検体を用いて、倫理委員会からの承認後グラニュリシン濃度の測定を行った。結果、グラニュリシン濃度は HIV 合併結核患者において健常者や HIV 陰性結核患者と比較して有意に上昇していた。③HIV 感染が活性型ビタミン D₃ によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討するために、平成 23 年 10 月以降の洪水の影響で中断されていたタイ NIH との共同研究を再開した。

A. 研究目的

HIV 感染症と結核はともに世界主要感染症であり、合併症はアジア・アフリカ地域において公衆衛生上深刻な問題となっている。グラニュリシンは、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、キラーT 細胞等の細胞溶解性顆粒に含まれるエフェクター分子で、強力な抗菌活性を持つと同時に細胞死を誘導し、組織障害にも関わっていると考えられる。

1. グラニュリシンは、自然免疫から適応免疫まで広範にエフェクター分子として生体防御機構に関与している。アジア人の潜在結核における血漿グラニュリシン濃度についての報告はまだなされていないため、ベトナム・ハノイにおける結核関連医療施設の健常な医療従事者における血漿グラニュリシン濃度を測定すると同時に、質問票ならびに BCG 接種痕の肉眼による確認による臨床疫学的なデータを収集し、関連解析を実施する。

2. 結核においては、有意に血漿グラニュリシン濃度が低下し、進行例ではとくに顕著であることが報告されているが、タイ・チェンライ県で実施した先行研究では HIV 合併結核において有意に血漿グラニュリシン濃度が上昇しており、HIV 合併結核特異的な機構が働いている可能性が示唆された。本研究では、日本人患者血液検体（血漿、血清）を用いて、

HIV 合併結核における血漿グラニュリシン値を測定し、タイ人患者から得られた所見を確認する。

3. HIV 合併結核の劇症さや重篤さに関しては、単球・マクロファージ系細胞の機能障害も関与しているのではないかという観点から、HIV 感染が活性型ビタミン D₃ によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討するため、タイ NIH との共同研究を開始する。

B. 研究方法

①本研究では、ベトナムのハノイ肺病院との連携研究を立ち上げ、ベトナム人健常医療従事者の血漿（血清）中グラニュリシン濃度の ELISA による測定を行う。ハノイ市内の 6 地区の保健センターとハノイ肺病院から健常な医療従事者を 100～120 名を文章によるインフォームドコンセントを得た上で登録し、末梢血を 1ml 採血する。同時に、年齢・性別・職歴・現職種・BMI・喫煙歴・飲酒歴・既往歴・マスク着用の有無等について質問紙に基づいて調査を実施する。BCG 接種については問診とともに BCG 痕を肉眼で確認する。また、全例胸部 X 線写真を撮影し、ハノイ肺病院の放射線科医がチェックする。グラニュリシン濃度の ELISA による測定後、臨床疫学的データの各項目とグラニュリシン濃度について

て単変量および多変量解析を実施する。

②国立国際医療研究センターの倫理委員会からの承認を得た後、現在生存している患者からのインフォームドコンセントを取得し、国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターからの検体提供を受ける。HIV 合併結核及び健常ドナー各々約 20 例の血漿ならびに血清中のグラニュリシン濃度を ELISA にて測定する。

③タイ NIH の Panadda 上級研究員との共同研究で、同施設の BSL2 ならびに BSL3 実験室において、HIV 感染が 25(OH)D₃ によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討することを目的としてマクロファージにおける抗酸菌の感染系を作製する。健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSF および GM-CSF 存在下にそれぞれ分化したマクロファージを得る。濃度を振った 25(OH)D₃ または同時に IFN- γ (100ng/ml) を培養上清に加えて BCG (MOI=3-5) を感染させ、0、3、6、12 と 24 時間後に全 RNA を抽出する。Real-time PCR にて CYP27B1、CYP24、IL-15、vitamin D receptor、cathelicidin の遺伝子発現を検出する。さらに同様の系で、将来 macrophage tropic な HIV-1 を感染させた M-CSF 分化マクロファージ (M-M Φ) (HIV 感受性) を用いて同じ遺伝子の発現を検出し、比較検討するための準備を整える。

C. 研究結果

①ベトナム側施設に対する技術移転ならびに国立国際医療研究センターとベトナム保健省における倫理承認取得は終了していたため、平成 24 年度 8 月 21-23 日に対象者の登録と質問紙を用いた臨床疫学的要因との間の関連解析を実施した。最終的に採血を含めてデータを取得できた対象者数は 102 名であった。解析の結果、各臨床疫学的要因とグラニュリシン濃度との間に有意な関連は認められなかった (Wilcoxon Rank-sum と Kruskal-Wallis にて検定)。

また、年齢、性別、BCG 接種、結核の既往歴、肺疾患既往歴、喫煙歴、飲酒歴、コーヒー・茶、睡眠時間との間の重回帰分析を実施したところ、性別：女性>男性(P=0.006)、飲酒：

無>有(P=0.04)との結果を得た。

②平成 24 年 5 月に国立国際医療研究センター倫理委員会から承認された後、同センター・エイズ治療開発センターの青木孝弘医師ならびに田村順子医師の協力で、HIV 合併結核 19 例(昨年 20 例と報告したが 1 例は結核ではなかったことが判明し除外した)、HIV(クオンティフェロンテスト陰性)21 例、健常ドナー 19 例の血漿(一部は血清)検体をすでに入手し、グラニュリシン濃度を ELISA 法により測定した。その結果、先行するタイ・チェンライ県における測定結果と同様に、HIV 合併結核患者の血漿中グラニュリシン濃度は、HIV 陽性非結核患者および健常者の濃度と比較して、有意に上昇していた。

③本研究は、M-M Φ における 25(OH)D₃ による活性化機構に対する HIV 感染の影響を検討するため計画され、平成 23 年に洪水により中断されていたが、研究を再開した。タイ・チェンライ県でのパイロット研究で、GM-M Φ でなく M-M Φ にのみ BCG 感染後のビタミン D 関連遺伝子の発現誘導が示唆されていたが、今回その結果を確認した。real time PCR の結果は、25(OH)D₃ の存在によって M-M Φ における関連遺伝子の発現ピークが早まる傾向が認められた。また、パイロット研究でも示唆されていたが、M-CSF によって刺激後 0 と 3 時間における発現が抑制されていることが確認された。現在、IFN- γ 存在下の関連遺伝子発現パターンを解析しているところである。

D. 考察

①潜在結核の病態生理と結核の発症に関与する要因分析は、結核対策を考える上で非常に重要であると考えられる。グラニュリシンは自然免疫から適応免疫まで広くエフェクター分子として、抗結核免疫に関与していると考えられている。HIV 陰性結核において、血漿グラニュリシン濃度が健常者より有意に低下していることは知られているが、抗結核標準療法で治療した場合血漿グラニュリシン濃度は上昇する。結核菌感染と潜在結核の成立とその後の活動性結核の発症とのグラニュリシンレベルの関連性は、横断的研究では明らかにすることはできず、IFN- γ release assay

と組み合わせた前向きコホート研究を実施することで、明らかにすることができると思われる。

②タイにおける先行研究のサンプルサイズが6例と少なく、さらに対象者が100%タイ族であったことのエスニシティの偏りから、日本人検体における確認を行う必要性があった。日本人HIV合併結核においても血漿中グラニューリン濃度は有意に上昇しており、HIV感染を背景にした免疫不全状態における結核の急激な発症と進行から考えて、短期間にグラニューリンが高発現ないしはグラニューリン陽性細胞が大量に動員される可能性が示唆された。今後、病理組織やHIV合併結核患者の末梢血の解析を通してさらなる研究が必要と考えられる。

③先行するタイの研究からHIV合併結核では、患者末梢血に比較的多くのCD8⁺T細胞が存在する例があること、血漿中IFN- γ 、TNF- α 、IL-12(p40)、IL-18、IP-10、オステオポンチン、CRPレベルが、HIV陰性結核やHIV感染に比較して、著明に上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、HIV合併結核では強い炎症が引き起こされ免疫系は過剰に活性化された状態であることが示唆された。しかし、多くの剖検病理所見からは、結核病変組織内の結核菌の増殖・負荷は非常に大きく、結核菌が宿主免疫機構によって効率的に殺菌されていないことは明らかである。また結核病変組織における肉芽組織の形成は乏しく、しばしば高度で広範な壊死が見られる。本研究は、こう言ったHIV合併結核の特徴の一部がHIV感染によるマクロファージ活性化の障害に由来するという仮説に基づく。25(OH)D₃が十分な濃度に達していなくても、M-M Φ はBCGを殺菌し、その際CYP27B1遺伝子が高発現し、一方VDRと抗菌ペプチドcathelicidin遺伝子はほとんど発現しないことは確認されている。今回は、25(OH)D₃(10⁻⁷M)の存在下またはIFN- γ (100ng/ml)存在下で上記遺伝子の発現レベルをreal time PCRで定量的に評価した。今後は、HIV-1を感染させたM-M Φ において同様の条件で各遺伝子の発現が影響されるかどうかを明らかにする予定である。

E. 結論

今回、実施された臨床疫学的要因と血漿グラニューリン濃度の関連解析では、性別と飲酒歴と血漿グラニューリン濃度との間に比較的弱い関連性が認められた。結核罹患率は男性優位であり、またアルコール依存症が結核の危険因子であることは以前から指摘されており、興味深い結果である。

活性型ビタミンD₃による活性化機構が、結核菌殺菌能を有する表現型のマクロファージで観察されたことにより、HIV感染によるマクロファージ活性化の障害が示唆された。

F. 健康危険情報

現時点で該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nada Pitabut, Shinsaku Sakurada, Takahiro Tanaka, Chutharut Ridruechai, Junko Tanuma, Takahiro Aoki, Pacharee Kantipong, Surachai Piyaworawong, Nobuyuki Kobayashi, Panadda Dhepakson, Hideki Yanai, Norio Yamada, Shinichi Ok, Masaji Okada, Srisin Khusmith, Naoto Keicho. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. Submitted to "International Journal of Medical Sciences".

2. 学会発表

1. M-CSF及びGM-CSFにより分化したヒト単球由来マクロファージにおける活性型ビタミンD₃関連遺伝子の発現解析」櫻田紳策、Panadda Dhepakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人 第83回実験結核研究会、千葉、2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当事項無し
2. 実用新案登録
該当事項無し

アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者 TLR・リポカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授

研究要旨

自然免疫応答に関わる Absent in Melanoma 2 (AIM2)の結核感染防御における役割をノックアウトマウスを作製し、解析した。AIM2 欠損マウスは、結核菌に対する感受性が高くなった。その分子機構として、AIM2 は、細胞質内に逃れた病原性結核菌の DNA 認識し、インフラマゾームの活性化、そして IL-1beta, IL-18 の分泌を誘導することにより、結核菌感染防御を担っていることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLR を介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。これまでに、マウスを用いた我々の解析から、リポカリン2や SLPI などの分子群が、結核感染における自然免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになっている。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、多剤耐性結核菌に対する、自然免疫系の活性化を利用した新規治療ワクチンの開発への基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

細胞内DNAセンサーとして同定された Absent in Melanoma 2(AIM2)の結核感染における役割を、遺伝子欠損マウスを定法により作製し、このマウスに結核菌を経気道的に感染させ、野生型マウスと感受性を比較する。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制

御の整った SPF 環境下で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

AIM2 欠損マウスに結核菌を経気道的に感染させ、その後の生存率を野生型マウスと比較した。その結果、AIM2 欠損マウスは、全例が7週以内に死亡した。また、感染4週後の肺や肝臓の結核菌数も AIM2 欠損マウスで有意に増加していた。このように、AIM2 欠損マウスは、野生型マウスに比べて有意に結核感染に対する感受性が高いことが明らかになった。AIM2 はインフラマゾームを活性化させ、IL-1beta/IL-18 などの IL-1 ファミリーサイトカインの分泌を誘導することが知られている。そこで、結核菌感染後の血清中の IL-18 の濃度を測定した。野生型マウスでは結核感染3週後に血清中 IL-18 濃度が上昇したが、AIM2 欠損マウスでは全く上昇しなかった。IL-18 は Th1 応答に関与していることが知られているので、次に結核感染3週後の脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの IFN-gamma 産生を解析した。その結果、AIM2 欠損マウスでは、IFN-gamma 産生が野生型マウスに比べて有意に低下していた。

さらに AIM2 の結核感染防御機構を解析した。AIM2 欠損マウス由来の腹腔マクロファージは、結核菌感染による caspase-1 (p10)

の発現が誘導されなかった。また、結核菌ゲノム DNA 刺激による IL-1beta, IL-18 分泌が認められなかった。また caspase-1 (p10) の発現も誘導されなかった。結核菌 DNA を Hoechst 33342 で蛍光ラベルし、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に感染させ、貪食胞を認識する抗 Rab7 抗体で免疫染色すると、貪食胞とマージする結核菌だけでなく、マージしない結核菌が認められた。

D. 考察

AIM2 欠損マウスは、結核感染に対する感受性が極めて高くなった。AIM2 は細胞内で DNA を認識し、インフラマゾームを活性化し、IL-1 ファミリーサイトカインの分泌を誘導する分子として知られている。実際、AIM2 欠損マウスでは、結核感染後の IL-18 濃度の上昇が認められなかった。今後、AIM2 がどのように結核菌を認識しているかを明らかにしていきたい。

E. 結論

AIM2 欠損マウスは結核感染に高感受性であった。また血清中の IL-18 濃度の上昇も認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int. Immunol.* 24, 637-644 (2012).

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention. 5th India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bagalore, India
2. Kiyoshi Takeda Regulation of intestinal homeostasis by innate

immunity. The 4th AsiaHORCs Joint Symposium, Buyeo, Korea, November 11-14, 2012

3. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012, October 23-26, 2012, Tokyo
4. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 34th Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan
5. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 7th RCAI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama.
6. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo.
7. Kiyoshi Takeda Regulation of gut homeostasis by innate immunity. ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo.
8. 竹田潔 腸管免疫と炎症制御 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012 年 7 月 20 日、福岡
9. 竹田潔 プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構 第 12 回日本抗加齢医学会総会、2012 年 6 月 24 日、横浜
10. 竹田潔 自然免疫と消化管疾患 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012 年 5 月 12 日、大阪
11. 竹田潔 自然免疫系による慢性炎症性腸

疾患の制御 第49回日本臨床分子医学会
学術総会、2012年4月13-14日、京都

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

HIV 感染者における次世代 Interferon γ Releasing Assay である クオンティフェロンゴールドに関する研究

研究分担者 青木孝弘 独立行政法人国立国際医療研究センター
エイズ治療・研究開発センター 医師

研究要旨

HIV 感染者における結核症の早期診断を目指し、インターフェロン γ 遊離試験の有用性を検討した。HIV 感染が判明した時点で、インターフェロン γ 遊離試験を施行することは、結核症の早期診断に有用である。CD4 値 $50/\mu\text{L}$ 以下の症例では、抗 HIV 療法による免疫能の改善で測定可能となるまで検査を繰り返し施行することが望まれる。

A. 研究目的

結核の診断に関しては、本邦でも BCG の影響を受けない客観性を有する検査であるインターフェロン γ 遊離試験 (Interferon γ Releasing Assay、以下 IGRA) がツベルクリン反応に代わり施行されるようになった。IGRA 法にはクオンティフェロン(QFT)と T-spot Tb の 2 種類がある。平成 18 年 1 月には第 2 世代の QFT であるクオンティフェロン TB-2G(QFT-2G)が保険収載され、本邦でも使用され始めた。さらに、QFT-2G を改良した第 3 世代 QFT であるクオンティフェロン TB ゴールド (以下 QFT-3G) が、本邦でも平成 22 年 4 月 1 日より保険診療で行なえるようになった。当院でも同年 8 月より QFT-3G による検査が開始された。本邦は結核中蔓延国であり、結核診断において IGRA に関する報告は多数あるが、HIV 感染合併結核における QFT-3G の報告は限られている。

QFT-3G は、結核菌特異抗原 (ESAT-6、CFP-10、TB7.7) により全血検体中に存在する T 細胞を刺激し、放出された IFN- γ を測定する。この際、陽性コントロールとして PHA (phytohem-agglutinin) で放出された IFN- γ の量を測定し、抗原刺激で放出された IFN- γ の量の差で、陽性、判定保留、陰性を判定する。HIV 感染症では、病態が進行すると CD4 陽性 T リンパ球 (CD4) が減少するため、IFN- γ が十分に放出されず、検査の結果が判定保留、または判定不可となる可能性が高くなるとされる。非 HIV 感染者にお

ける QFT-3G の感度が 90%以上であるのに対し、HIV 感染者では、QFT-3G の感度が 80%前後とする報告もある。以上より、HIV 感染者において QFT が陽性、判定保留、判定不可となった患者の背景を検討することで、HIV 感染者における QFT-3G の検査特性を検討できると考えられる。

平成 24 年度は、次世代 IGRA である QFT-3G の HIV 感染者における検査特性の解明と本邦独自の新たな HIV 感染者での診断法としての検討を行なうことを目標とした。

B. 研究方法

平成 23 年 4 月から平成 24 年 3 月までに当センターを受診した新規 HIV 患者のうち抗 HIV 療法を導入前で、書面による研究参加の同意が得られた患者について、QFT-3G を施行した。

QFT-3G が陽性となった患者では、通常の保険診療の範囲内で精査を施行し、結核症の有無の診断を進める。結核症の存在が示唆された場合は、潜在性、活動性を問わず、通常の保険診療の範囲内で適切な治療を行う。

QFT-3G の結果が判定保留または判定不可であった患者は、患者の受診に併せて QFT-3G を施行し検査結果を経過観察することで、QFT-3G の結果に影響を与える因子について検討する。

QFT-3G の結果が陰性であった患者では、QFT-3G 検査時より 1 年間結核発症の有無について経過観察を施行し、結核発症が疑われ

た場合は、結核症の精査と QFT-3G を施行する。

(倫理面への配慮)

本研究は、独立行政法人国立国際医療研究センター倫理委員会にて、研究開始前に承認を受け実施している。また、被験者に対して口頭および書面にて研究内容を説明し、同意書を取得の上で研究に参加いただいている。

C. 研究結果

登録患者数は 149 例で、男性が 140 例(94%)、年齢の中央値は 38 歳(18-63)、国籍は日本 131 例(87.9%)、男性同性愛者 126 例(84.6%)、CD4 の中央値は 240(4-819)であった。同期間の当院の新規 HIV 患者は 220 例で、その患者背景と有意差はなかった。149 例中に活動性結核 4 例(2.7%)、潜在性結核 4 例(2.7%)を認めた。

QFT-3G の判定結果は、陽性例 7 例(4.7%)、判定保留 11 例(7.4%)で、日本国籍 131 例に限ると、陽性例は 5 例(3.8%)、判定保留 8 例(6.1%)であった。判定不可は、8 例(5.4%)で、全例 QFT-3G 施行時の CD4 値が $50/\mu\text{L}$ 以下であった。QFT-3G の判定別の患者背景を見ると、判定不可群で有意に CD4 値が低い以外には、年齢、性別、国籍、および感染経路に群間差はなかった。

QFT-3G 陽性例 7 例中、活動性結核が 3 例、潜在性結核が 4 例であった。活動性結核例は、全例標準的結核治療に反応し奏功したが、QFT 値は必ずしも低下を認めなかった。潜在性結核例は、全例イソコチン 300mg/日にて 9 ヶ月治療を行ったが、QFT 値は必ずしも低下を認めなかった。

判定保留例 11 例では、1 例は活動性結核(QFT 値 0.30)、1 例は判定保留持続、7 例は以後 2 回連続陰性、1 例は 2・5 回目が陽性で 3・4 回目は陰性となった。2 例は追跡不能であった。

判定不可例 8 例では、抗 HIV 療法を開始後、全例で QFT 判定可能となった。CD4 1 桁(CD4 値 $4/\mu\text{L}$)でも判定可能な症例を認めた。また、1 例は判定可能となった後に QFT 陽性となった。

陰性例は 123 例で、初診時の胸部単純写真

上で、明らかな結核患者は認めなかった。QFT 施行後 1 年間経過観察を施行し、明らかな結核発症例は認めなかった。陰性例の 1 例で QFT 陽転化を生じた。この症例では、吃逆の精査時に QFT 陽性と判明した(初診時 QFT 値 $-0.13 \rightarrow 8$ か月後 5.1)。気管支肺胞洗浄液などにて精査するが、確定診断は得られなかった。抗酸菌症については、各種検体で塗抹・培養・PCR とともに全て陰性であった。抗酸菌症の治療は導入しなかったが、症状、画像、QFT 値とも改善傾向となった。

D. 考察

当院における新規 HIV 感染者 149 例中の QFT 陽性率は 4.7%で、陽性例は全例活動性結核または潜在性結核の診断となり、QFT-3G の特異度は高い。

新規患者で QFT-3G を施行することにより、149 例中で 4 例の潜在性結核の患者を発見することができた。HIV 患者に初診時にルーチンで QFT を施行することで、結核発症率が高い HIV 患者で結核を早期に発見できる可能性がある。

判定不可症例では、抗 HIV 療法開始後に CD4 値 $50/\mu\text{L}$ となり QFT が判定可能となるまで、QFT を施行すべきである。

HIV 患者における QFT 判定保留の扱いについては、結核を無治療にて経過観察中に、QFT-3G の結果が変動する症例が多い。米国では判定として判定保留を用いておらず、今回の判定保留症例 11 例は、米国の基準では全例陰性となることも考慮すると、判定保留例については慎重な臨床診断と経過観察を要すると考える。

E. 結論

HIV 患者では、結核菌への暴露後の結核発症率が、非 HIV 患者に比べきわめて高い。米国では、HIV 患者全例で HIV 診断時に IGRA(QFT または T spot TB)の施行を推奨している。本邦は結核中蔓延国(2011 年：人口 10 万人対で 17.7 人)であり、結核菌への暴露のリスクは米国より高いと考えられる。本邦でも、HIV 感染が判明した時点での IGRA 施行は有意義であると考えられる。また、CD4 値

50/ μ L以下の症例では、抗 HIV 療法による免疫能の回復により QFT-3G が判定可能となるまで検査の施行を繰り返すことが望ましい。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 青木孝弘：HIV 感染者における第 3 世代 QFT の有用性の検討(第 88 回日本結核病学会総会 平成 25 年 3 月)
2. 青木孝弘：ミニシンポジウム 3 合併症を有する結核治療 HIV 合併結核(第 88 回日本結核病学会総会 平成 25 年 3 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社・代表取締役社長

研究要旨

東アジア地域で蔓延しつつある多剤耐性結核に対して有効な新規ワクチンの開発を目的として、次世代のワクチン技術として注目されている DNA ワクチンの開発を行った。DNA ワクチンの開発を成功させるためには、より少ない用量で有効性を高める必要があるため、ワクチン効果を高める新規アジュバントとして注目されている HVJ-E を用いた免疫増強や安全性評価を行った。その結果、HVJ-E による自然免疫や細胞性免疫の活性化には、RIG-I を介した新規メカニズムが関与する事などが明らかとなった。更に、臨床治験への移行を目指し、規制当局である PMDA との品質面での相談についても開始した。

A. 研究目的

東アジア地域（日本、韓国、台湾、中国）において感染制御が重要となる多剤耐性結核（MDR-TB）に対して、予防・治療効果のある新規DNAワクチンの臨床応用の実現を目的として研究開発を実施した。

具体的には、新規DNAワクチンの重要な成分であるHVJ-Eを用いた研究を中心として安全性の実証と、有効性の向上を目的として非臨床試験（動物試験）を実施した。

これにより本事業で研究開発を進めている新規結核DNAワクチンの早期の臨床応用ための準備を進めた。また、新しいコンセプトのワクチンとして、東アジアの広範な国々への普及を目的として研究を展開した。

B. 研究方法

抗原たん白質であるHSP65と細胞性免疫活性化に有用なIL-12を一つのプラスミドDNAで同時に発現させるDNAワクチンを、感染症の予防と治療に有効な新しいコンセプトのワクチンとして開発するために必要なデータの取得を行った。

そのために、新規DNAワクチンのアジュバント兼DDSとして使用しているHVJ-Eに関して動物を用いて安全性や有効性に関する非臨床試験データの取得を実施した。

これまでに基礎的なデータの取得については完了しているので、本年度は大阪大学医学部

附属病院が実施している、抗癌剤としての臨床試験からの安全性、有効性（免疫活性化）に関するフィードバック情報を参考にして以下のような非臨床試験データの取得を進めた。

1) HVJ-Eの安全性評価

本事業で開発を行っているDNAワクチンのデリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eの安全性については、小動物としてはラット、中動物としてはカンクイザルを用いて評価試験を実施した。予備試験については信頼性基準に適合する試験として実施し、予備試験で取得したデータを根拠としてデザインを行った本試験についてはGLP試験として実施している。

それらの試験で取得したデータは、ガイドラインに従って臨床応用の際に申請用のデータとして使用できるレベルのデータである。特に、安全性試験については、予備試験、本試験共に基本的にGLP適合試験施設で実施した。また、サイトカイン産生の基礎検討については、カンクイザルを用いた試験で調製したサンプルを使用し、臨床検査を実施している試験施設で測定試験を実施する事でデータの品質を確保した。

臨床におけるHVJ-Eの安全性評価は、大阪大学医学部附属病院が実施している。臨床試験は学内の倫理委員会の承認後に実施され、進行性悪性黒色腫（腫瘍内投与、皮内投与）、去勢抵抗性前立腺癌（腫瘍内投与、皮下投与）のそれぞれを対象疾患とした、第I/IIa相試験が実施さ

れており、本年度末までにそれぞれの臨床試験について6例と3例の症例数でCTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) に従って安全性評価が実施された。

2) HVJ-Eによる免疫活性化の検討

特に免疫誘導については、自然免疫と獲得免疫についてヒトの臨床試験のデータを参考にして、免疫活性化メカニズムや免疫毒性など必要な非臨床試験データの取得を進めることとした。

HVJ-Eによる獲得免疫の誘導については、HVJ-Eを皮下投与した後の抗体産生を指標とした評価試験を実施した。

HVJ-Eによる自然免疫活性化の評価についてはマウスを用いた試験で評価した。デリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eをマウスに投与し、免疫の活性化と、投与可能な最大用量における安全性(免疫抑制効果が認められるかどうか)について脾細胞を用いたNA細胞アッセイにより評価を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、微生物実験、動物取り扱いに関する指針などに従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行った。

また、実験に従事するものの安全確保についても、独立行政法人 産業技術総合研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加、またはe-ラーニングでの研修を実施し、別途健康診断も受診して実験従事者の健康管理も確保した。

C. 研究結果

抗原たん白質であるHSP65と細胞性免疫活性化に有用なIL-12を一つのプラスミドDNAで発現させる新規結核DNAワクチンに関する研究を行った。

1) HVJ-Eの安全性評価

ワクチンのアジュバント兼DDSとして使用しているHVJ-Eについては、大阪大学医学部附

属病院で進められている臨床試験の結果からサイトカインを誘導することが示唆されている。

そこで、HVJ-Eの皮下投与後にサイトカインストーム(サイトカインの急激な異常産生)のような急激な免疫反応の亢進が認められるかを検討した。

検討を実施するサイトカインとしては、大阪大学医学部附属病院の臨床試験においてHVJ-Eの投与後に産生誘導が認められたIL-6とIFN- γ を選択し、カニクイザルのGLP安全性試験で採取した血清を用いてELISA法により、投与前後の血清中のサイトカインレベルを検討した。

その結果、HVJ-E投与後のカニクイザル血清中のサイトカイン産生量(IL-6とIFN- γ)は、共に正常動物と同じ範囲内であり、サイトカインストームを示唆する異常産生は認められなかった。

この結果から、HVJ-Eは、ワクチン作用に重要な免疫を誘導するが、サイトカインストームのような免疫毒性については発現しない事が示唆された。

2) HVJ-Eによる免疫活性化の検討

ワクチンのアジュバント兼DDSとして使用しているHVJ-Eについては、大阪大学医学部附属病院で進められている臨床試験の結果から抗体産生やNK細胞活性の誘導が示唆されている。

そこで、投与後の抗体産生を確認するための試験を、ラットを用いたGLP試験として実施した結果、HVJ-Eの皮下投与開始2週間後から抗体の産生が認められ、4週間後まで抗体価が上昇する事が明らかとなった。

また、誘導される免疫反応の詳細なプロファイル解析として、自然免疫(NK細胞活性化)の活性化について検討を行った。マウスを用いてHVJ-Eを皮下投与した前後のNK細胞の活性を指標とした評価を実施した結果、HVJ-Eの投与後にNK細胞の活性化が認められることが明らかとなった。HVJ-Eの投与によるNK細胞の活性化は、投与可能最大用量でも抑制は認められなかったことから、HVJ-Eの投与用量を増加した場合でもNK細胞の活性化は抑制されない事が示唆された。

更に、今後の臨床治験の実施の準備として、

HVJ-Eの品質に関してPMDA（医薬品医療機器総合機構）の薬事戦略相談を行った。その結果、主に治験開始時に必要な安全性確保の方向性に関するコメント得ることが出来た。また、臨床試験に移行する際に必要な追加試験の必要性などを確認するために、PMDAとのHVJ-Eの品質に関して対面助言を受け、ワクチンの臨床治験開始にも必要な治験薬の品質確保を進めている状況である。

D. 考察

1) HVJ-Eの安全性評価

本事業で研究を進めているDNAワクチンの構成成分であるHVJ-Eに関して安全性の評価を行なった結果、特に重篤な有害事象は認められず、安全性が高い事が示唆された。

HVJ-E投与によるサイトカイン産生についての検討結果から、血清中に産生される炎症性サイトカインレベルは正常動物（カニクイザル）で認められる変動の範囲内でありサイトカインストームに繋がるような急激な異常産生の可能性は低いと示唆された。

実際、大阪大学が実施している臨床試験においてもサイトカインの異常産生が原因と考えられる重篤な有害事象の発生は認められていない。そのため、HVJ-Eの投与による炎症は投与部位の局所反応であり、全身性の重篤な炎症反応を誘導する可能性は低いと考えられた。

その他の安全性試験データとして、現在までに臨床治験の開始に必要なGLP安全性試験データ（一般毒性、特殊毒性、トキシコジェネティクス、安全性薬理など）の取得を完了している。本事業のDNAワクチンの臨床応用を開始する際の治験届用データの一部として使用できる状況であり、早期の臨床試験の開始が望まれる状況である。

2) HVJ-Eによる免疫活性化の検討

抗体産生についてはHVJ-Eの投与開始後1週間では産生が認められず、2週間以降に産生誘導が認められた。しかし、それに伴う重篤な有害事象は認められておらず、免疫活性化に伴うリスク面で特に問題となる事象は発現しない事が示唆された。

また、マウスの皮下にHVJ-Eを投与すると、

NK細胞の活性化が認められたことから、ワクチンのアジュバント兼DDSとして使用しているHVJ-Eは、獲得免疫に加え、自然免疫も活性化する事が示唆された。

HVJ-Eの粒子内には、核酸成分（1本鎖RNA）が含まれており、それが細胞内核酸受容体RIG-I（Retinoic acid Inducible Gene-I）に結合して、免疫誘導に必要なシグナルを活性化する事が明らかとなっている（図1）。RIG-Iは、ウイルス感染などによる細胞内への外来核酸の侵入を認識する新規分子である。そのため、この分子を介するシグナル伝達系の活性化により、結核菌やウイルスなど細胞内で増殖する病原体に対する生体防御反応の亢進を期待できる。

RIG-Iを標的分子とする医薬品で、臨床段階まで開発が進んでいるものは国外も含めてHVJ-Eのみであり、開発面での優位性を確保している状況である。また、本事業を中心とする新規ワクチンのアジュバント（HVJ-E）の応用研究、RIG-Iの機能解析、臨床試験は、いずれも国内の研究者が独自に進めてきた独創的な成果であり、国内の基礎研究の成果を基盤とした有効性の高い革新的な新規ワクチンの開発を期待できる。

E. 結論

- (1) DNAワクチンの構成物質であるHVJ-Eに関して治験開始に必要な試験データ取得が進捗、薬事戦略相談、対面助言を実施し、必要な追加データについての見解を取得
- (2) 臨床研究、動物試験データからDNAワクチンの構成物質であるHVJ-Eにより、結核感染症に対して有効な免疫反応（自然免疫、細胞性免疫）を誘導できる事を示唆するデータを取得
- (3) 大阪大学医学部附属病院がメラノーマを対象とした臨床試験（6例）を完了、来年度から臨床治験開始。更に去勢抵抗性前立腺癌を対象とした臨床試験も開始、低用量3例の投与を完了、来年度から高用量の投与と臨床治験を開始する見込み
- (4) HVJ-Eの粒子内の核酸（RNA）が、新規標的分子RIG-Iのシグナルを活性化する事が明らかとなり、不活性化したウイルス粒子であるHVJ-Eが、天然の核酸デリバリーシステムとなることが期待される。国内の独創的な研究開発

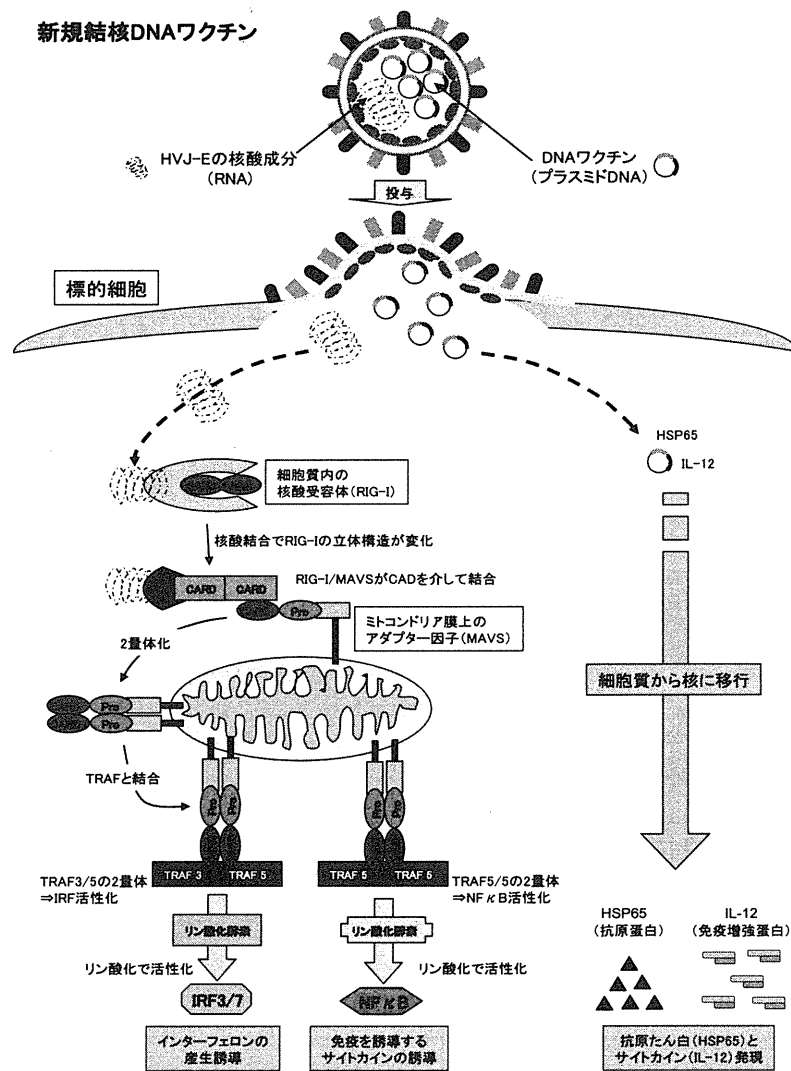


図1 新規DNAワクチンの革新的な作用メカニズム

成果により、革新的な新規ワクチン開発に繋がる可能性

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima T., Novel gene transfer systems: intelligent gene transfer vectors for gene medicines., Curr Top Med Chem. 2012 Aug 1;12(15):1594-1602.

2. Nakajima T., Itai T., Wada H., Yamauchi T., Kiyohara E., and Kaneda Y., (2013), A Novel Therapy for Melanoma and Prostate Cancer Using a Non-Replicating Sendai Virus Particle (HVJ-E), Novel Gene Therapy Approaches, Prof. Ming Wei (Ed.), ISBN:978-953-51-0966-2, InTech, DOI:10.5772/55014. Available from: <http://www.intechopen.com/books/novel-gene-therapy-approaches/a-novel-therapy-for-melanoma-and-prostate-cancer-using-a-non-replicating-senda-i-virus-particle-hvj-e>

3. Okada M., Kita Y., Nakajima T., Hashimoto S., Nakatani H., Nishimatsu S., Nishida Y., Kanamaru N., Kaneda Y., Takamori Y, McMurray D., Tan EV., Cang ML., Saunderson P. and Cruz ECD., The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis., Hum Vaccin Immunother. 2012 Dec 18;9(3).

4. Kita Y., Hashimoto S., Nakajima T., Nakatani H., Nishimatsu S., Nishida Y., Kanamaru N., Kaneda Y., Takamori Y, McMurray D., Tan EV., Cang ML., Saunderson P., Cruz ECD. and Okada M., Novel therapeutic vaccines [(Hsp65+ IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy., Hum Vaccin Immunother. 2012 Dec 18;9(3).

2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし