

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 公益財団法人結核予防会結核研究所 生体防御部長
土方美奈子 同 病理科長
松下育美 同 免疫科研究員

研究要旨

ベトナム南部の結核拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院と共同で、多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を明らかにすべく、断面研究を実施した。58名の多剤耐性結核患者について、近年、結核感受性遺伝子の候補の一つとして注目され、機能的には細胞内シグナルに対して負の制御を行う脱リン酸化酵素である dual specificity phosphatase 14 遺伝子 (DUSP14) の遺伝子多型と免疫関連遺伝子発現に関する検討を行った。DUSP14 イントロン 1 に局在する C/T SNP (rs712039) の C アリルは DUSP14 の遺伝子高発現型として知られているが、治療中の多剤耐性結核患者全血を用いた検討では、その C アリル数 (0、1、2) に依存して血液細胞由来の TNF 遺伝子発現量が低くなる傾向がみられた。しかし、C アリル数は DUSP14 遺伝子発現量自体とは有意な関連を示さなかった。さらに DUSP14 プロモーター領域に位置する C/G SNP と上記 rs712039 SNP により生成される 3 つのハプロタイプのうち遺伝子高発現型と推定される H2 ハプロタイプ数 (0、1、2) に依存して、全血中の IL12 レセプター α 1 mRNA など Th1 系免疫関連遺伝子の発現量が低くなる傾向が認められた。免疫炎症制御に関連して注目される DUSP14 の遺伝子多型が、トランス的作用を通じて結核免疫にも関連している可能性が示された。

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主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

子変異を有する菌が選択的に増殖することが重要とされており、結核医療に関わる人為的要因や制度が一義的な課題であるが、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能なども発生に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。

このような試みの一つとして、最近、血液細胞のトランスクリプトーム解析により得られる遺伝子発現プロファイルから、結核における発現シグネチャーを明らかにして病態解明へつなげる研究が行われており、いくつかの網羅的解析の報告が出ている。

2011年に Barreiroらは、健康成人 65人から単球由来樹状細胞を誘導し、全ゲノムジェノタイピングと *in vitro* 結核菌暴露による宿主遺伝子発現変化のトランスクリプトーム解析とを行い、その結果 198個の有意な量的形質座位 expression quantitative trait

locus (eQTL)を見いだした。さらに、ガーナおよびガンビアの 2,237 肺結核患者と 3,122 コントロールサンプルを用いた genome-wide association study (GWAS) データの再解析を行い、その結果、DUSP14 (dual specificity phosphatase 14) の SNP rs712039 が結核患者集団と最も有意な関連を示すことを報告した ($P_{\text{GWAS}} = 3.30 \times 10^{-6}$; Barreiro LB, et al PNAS 109:1204-9, 2012)。

DUSP14 は二重特異性タンパク脱リン酸化酵素 (DUSP) ファミリーに属し、リン酸化により活性型となった MAP キナーゼ (MAPK) のリン酸化セリン/スレオニンとリン酸化チロシンをととも脱リン酸化し、MAPK を不活性化状態に戻す、ネガティブ・フィードバックの働きを有しており、サイトカインの発現量を調節するなど、重要な免疫炎症制御の役割を担っていると考えられている。Barreiro らは実際に *in vitro* で DUSP14 の機能的 SNP である rs712039 と主要な免疫系サイトカインである TNF- α および IFN- γ の産生量が有意に関連している (トランスに働いている) ことを報告している。

我々は、regulatory SNP により規定される DUSP14 の発現量の違いが結核免疫の個体差、さらに多剤耐性結核の病態に関与している可能性を考え、多剤耐性結核患者の血液中で、SNP rs712039、あるいは同価の SNP がシスに働き、DUSP14 の遺伝子発現量を調節していること、また同 SNP がトランスに働き、免疫関連分子や炎症性サイトカインの発現量を制御しているか否かを検討した。

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 18 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。

多剤耐性結核患者 58 名のゲノム DNA から PCR にて DUSP14 遺伝子のプロモーター領域、エクソン領域を増幅し、ダイレクトシーケンスにより遺伝子配列を決定した。見いだされた遺伝的多型間の連鎖不平衡構造解析を行った。

全血より抽出した total RNA を用い、DUSP14 遺伝子および免疫関連分子 (GNLY, PRF1, GZMB, STAT1, STAT4, STAT6, CXCL10, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, IL12A, SPP1, IL10, TGFB1, IL23A, TNF, LTA, IL15, IL18, FOXP3, TBX21, GATA3, HIF1A, IL4, IL4d2, RORC, IL2) 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 ($n=48$)。

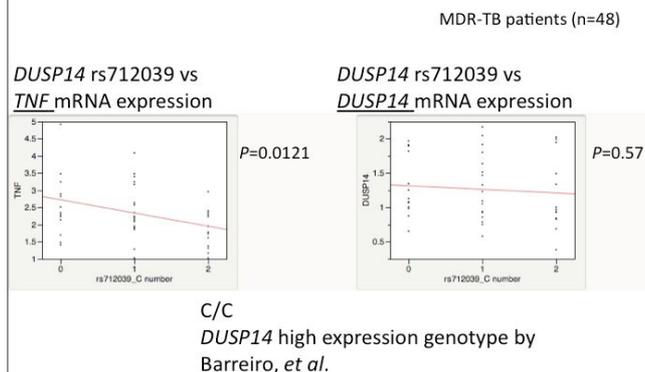
(倫理面への配慮)

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

ベトナム人 58 名のプロモーターおよびエクソン領域のシーケンス解析で、15 カ所の部位で塩基の違いが認められた。HapMap のアジア人 (中国人および日本人) のデータから、DUSP14 遺伝子領域はひとつの連鎖不平衡ブロック内にあったが、ベトナム人においても見いだされた多型の解析から同様の結果が得られ、Barreiro らの報告した DUSP14 のイントロン 1 内に存在する rs712039 SNP は、プロモーター領域にある rs853196 および rs853197、エクソン 2 の 5'UTR 内

図1 DUSP14 SNP(rs712039) の遺伝子型と全血球細胞のTNF、DUSP14遺伝子発現



rs1051838 と完全な連鎖不平衡状態にあることが明らかになった。

全血より抽出した total RNA から定量的 RT/PCR により、DUSP14 の mRNA 発現量と上記遺伝子配列解析で得られた各遺伝的多型との関連を検討したが、有意でなかった ($P=0.57$) [図1右]。一方、全血球細胞の TNF 遺伝子発現量は、Barreiro らによる rs712039 の DUSP14 高発現アリルとして知られる C の数に依存して低くなる傾向がみられた ($P=0.0121$) [図1左]。

DUSP14 遺伝子プロモーター領域にある C/G SNP rs62076700 と rs712039 によって 3 ハプロタイプ H1, H2, H3 の存在が推定された [図2]。

このうち、高発現型と予想される H2 に依存して、全血中の IL12RB1 mRNA 発現が有意に低くなった ($FDR < 0.05$)。他のいくつかの Th1 系免疫関連遺伝子の mRNA 発現量でも同様の傾向がみられたが、多重比較を考慮すると有意差には至らなかった [図3]。既報と同様にベトナムにおいても、DUSP14 遺伝子多型頻度が結核症と関連 (疾患感受性) を示すか否かについて現在検討中である。

D. 考察

DUSP14 は、T 細胞が刺激された時、早期に発現誘導され、CD28 と相互作用し、MAPK を不活化して副刺激分子からのシグナルを抑制する分子 MKP6 (MAP kinase phosphatase-6) として見いだされた (Marti F, et al J Immunol 166:197-206, 2001)。しかしながら、他の DUSP ファミリーと比べ

図2 DUSP14のプロモーターSNPを含むハプロタイプ

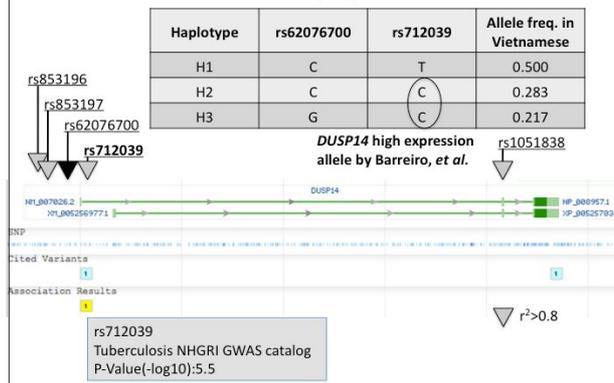
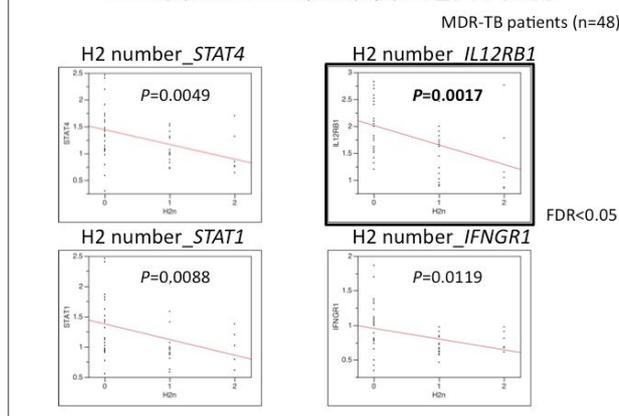


図3 DUSP14 ハプロタイプ H2と全血球細胞のTh1系免疫関連遺伝子発現



て DUSP14 に関する知見はまだ少なく、その発現や役割に関しては不明な点が多い。

Barreiro らは、健康成人末梢血から誘導した単球由来樹状細胞 (非刺激時) において、DUSP14 rs712039 の遺伝子型と DUSP14 mRNA 発現量が関連することを見だして報告したが、結核菌暴露後の同細胞では有意差がみられていない。我々の多剤耐性結核患者の全血由来の total RNA からの検討では、遺伝子型と mRNA 発現量に有意な関連がみられず、それぞれの細胞での、感染時の DUSP14 の発現についてはさらに検討が必要である。

一方、今回の我々の結果から、DUSP14 の遺伝的多型のハプロタイプと Th1 系免疫関連遺伝子である IL12RB1 mRNA 発現量には有意な関連がみられており、DUSP14 遺伝的多型によって Th1 系免疫関連遺伝子発現がトランスに影響を受けているのではないかと

推測される。また、既報の rs712039 SNP 単独の効果より、プロモーター領域の SNP を含めたハプロタイプの方が、遺伝子発現とより強く関連する可能性が示唆されたため、プロモーター領域の SNP の機能的意義が注目される。

今回の結果から、DUSP14の低発現型が Th1 応答の増強を通じ、結核の発病や病態において宿主に有利に働く可能性があると考えられた。最近、DUSP14 が TAK1(TGF- β -activated kinase 1)の脱リン酸化により、TNF- β と IL-1 による NF- κ Bの活性化を阻害することが明らかにされ(Zheng H, et al. JBC288:819-825, 2013)、DUSP14 の持つ機能が注目されている。多剤耐性結核患者において、DUSP14 による Th1 応答や炎症性サイトカイン反応の制御がどのように病態に影響するか等については、今回の検討では症例数が少ないため、今後、より大規模な研究で検討する必要がある。

E. 結論

免疫炎症制御に関連する脱リン酸化酵素として注目される DUSP14 の遺伝子多型がトランス的作用を通じて結核免疫にも関連する可能性が示された。

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、相対的にアジア人の多剤耐性結核対策の重要度が増していくものと推測される。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. 研究発表

1. 論文発表

1. Hang NTL, Maeda S, Lien LT, Thuong PH, Hung NV, Thuy TB, Nanri A, Mizoue T, Hoang NP, Cuong VC, Ngoc KTT, Sakurada S, Endo H, Keicho N. Primary drug-resistant tuberculosis in Hanoi, Viet Nam: present status and risk factors. PLoS One 8 (8): e71867, 2013.

2. Hung NV, Ando H, Thuy TT, Kuwahara T, Hang NT, Sakurada S, Thuong PH, Lien LT, Keicho N. Clonal expansion of Mycobacterium tuberculosis isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis in Hanoi, Vietnam. BMC Res Notes 6: 444, 2013.

3. Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Ridruechai C, Tanuma J, Aoki T, Kantipong P, Piyaworawong S, Kobayashi N, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Oka S, Okada M, Khusmith S, Keicho N. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. Int J Med Sci 10 (8): 1003-1014, 2013.

2. 学会発表

1. Hang NTL, Hijikata M, Sakurada S, Tam DB, Ngoc PTM, Thuong PH, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Latent tuberculosis infection assessed by interferon-gamma release assay and mRNA expression levels of immune-related genes. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.
2. Hang NTL, Maeda S, Thuong PH, Hoang NP, Hung NV, Cuong VC, Hijikata M, Sakurada S, Lien LT, Keicho N. Sublineages of Mycobacterium tuberculosis and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai,

Japan, 2014.

- 3 . Hijikata M, Matsushita I, Hang NTL, Thuong PH, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Dual-specificity phosphatase 14 gene polymorphism in Vietnamese patients with pulmonary tuberculosis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.
- 4 . Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T, Dhepakson P, Yanai H, Yamada N, Okada M, Khusmith S, Keicho N. Potential function of granulysin, perforin, IFN-gamma and lymphocyte subsets in patients with Tb and HIV/Tb coinfection. In: 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.
- 5 . Sakurada S, Thuong PH, Ngoc PTM, Hang NTL, Tam DB, Hong LT, Cuong VC, Tanaka T, Lien LT, Keicho N. Granulysin in HIV/TB coinfection and latent TB infection. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Jan 23-24, 2013, Tokyo, Japan, 2013.
- 6 . Tanaka T, Sakurada S, Takakura M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Keicho N. A biomarker study of tuberculosis by two-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Jan 23-24, 2013, Tokyo, Japan, 2013.
- 7 . Thuong PH, Tam DB, Sakurada S, Hang NTL, Hong LT, Hijikata M, Ngoc PTM,

Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Latent tuberculosis infection assessed by interferon-gamma release assay and circulating granulysin levels. In: 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, November 11-14, Yokohama, Japan, 2013.

G . 知的財産権の出願・登録状況