

[] 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、平成 23年度は、抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 NAT2の検討、平成 24年度は、結核自然免疫に関連する宿主側遺伝子 mannose binding lectin (MBL2) の検討、平成 25年度は、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。NAT2 遺伝子型は、イソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の割合がほぼ 1 : 1 であり、ベトナムでは遅延型 (S) が日本、韓国より多く、ヨーロッパ集団よりは少なかった。多剤耐性結核で遅延型 (S) が少ない傾向を示す結果が得られたが検出力が低く有意差には至らなかった。MBL2 の遺伝子型により、明確に 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 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 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。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、その C アリル数に依存して多剤耐性結核の血液細胞由来の 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 遺伝子高発現型と推定される H2 ハプロタイプ数に依存して、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、トランスの作用を通じて結核発症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が、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手法により明らかにすることを目的とした。

平成 23年度は、特に抗結核剤の代謝と深く関係する NAT2 遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度の解析を試みた。NAT2 遺伝子は多型性に富み、20 以上の対立遺伝子型を有するが、その中で特にイソニアジドを迅速に代謝する迅速代謝型

(F) と代謝遅延型 (S) は、主に 3 つの非同義置換 341T>C (rs1801280)、590G>A (rs1799930)、857G>A (rs1799931) によって決定されており、これらにより遺伝子型の分類を試みた。

平成 24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、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、アジア人集団では本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ため、本検討を行った。

平成 25年度は、量的形質座位 expression quantitative trait locus (eQTL 解析と genome-wide association study (GWAS) を組み合わせることで新たに結核感受性遺伝子の候補として同定され

た (Barreiro LB, et al. PNAS 109:1204-9, 2012) DUSP14 (dual specificity phosphatase 14) の遺伝子多型を中心に検討を行った。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化型となった 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もに脱リン酸化し、MAPK を不活性化状態に戻し、サイトカインの発現量を調節するなど免疫炎症制御の役割を担っている。

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 (NH, 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。また多剤耐性結核患者ゲノム DNA から PCR にて各種遺伝子多型を同定した。

NAT2 遺伝子タイピングは、主に 3 つの非同義置換 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931) を同定することにより、実施した。

MBL 遺伝子タイピングは、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 600 bp 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。

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, MIP1b, 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。

DUSP14 遺伝子タイピングは、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,

表1 ベトナムにおける多剤耐性結核の NAT2 遺伝子型から推測されるイソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の分布

Genotype	Activity	MDR-TB (n=58)		HC (n=111)		P-value	Fisher
		Count	Percentage	Count	Percentage		
Fast/Inter-mediate/Slow	Fast	12	20.7%	31	27.9%	0.025	2x3
	Inter-mediate	35	60.3%	43*	38.7%		
	Slow	11	19.0%	37	33.3%		
Allele	Fast	59	0.509	105	0.473	0.567	2x2
	Slow	57	0.491	117	0.527		

* HC did not follow Hardy-Weinberg Equilibrium

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

1) NAT2 遺伝子型

ベトナム人の NAT2 遺伝子型は、他の東南アジア集団における報告と同様、イソニアジド迅速代謝型 (F) と代謝遅延型 (S) の割合は、ほぼ 1 : 1 であり (表 1)、日本、韓国など東アジア集団より遅延型 (S) が多く、ヨーロッパ集団よりは遅延型 (S) が少なかった。

多剤耐性結核では、表に示すように、対照集団より、遅延型 (S) がより少ない傾向を示す結果が得られたが、対照集団の遺伝子型分布の偏位、検出力の問題が未解決で残っており、今後、より大規模な研究で、この結果を確認する必要がある。

2) MBL2 遺伝子型

MBL2 遺伝子は高発現型 (YA/YA)、中発現型 (YA/XA)、低発現型 (それ以外) に分けられた。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)。

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 1)。

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 (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)。

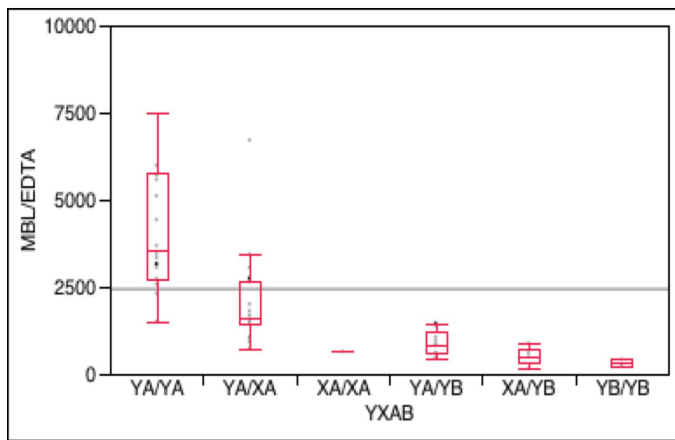


図1 MBL2 遺伝子型と多剤耐性結核治療中の血漿 MBL 濃度 (N=58)

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 ($P=0.006$)。

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 , $P=0.003$)。

3) DUSP14 遺伝子型

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、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 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、有意差はみられなかった ($P=0.57$)。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 ($P=0.0121$)。

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、このうち高発現型と予想される H2 のハプロタイプ数に依存して、全血中の IL12RB1 mRNA 発現が有意に低値を示した ($FDR<0.05$)。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 2)。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も検討中である。

D. 考察

ベトナム人における多剤耐性結核と宿主要因の関連について、本研究班の 3 年間で、初めてアプロー

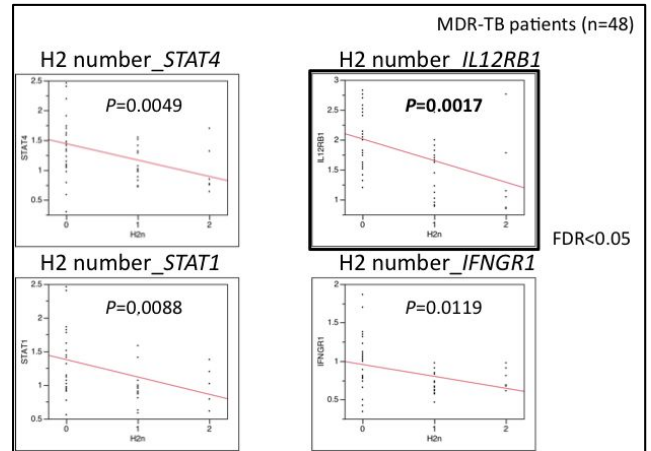


図2 DUSP14 ハプロタイプ H2 と全血球細胞の Th1 系免疫関連遺伝子発現

チした。NAT2 遺伝子の遺伝子型は、これまでイソニアジドによる肝障害が遅延代謝型 (S) に多いことが報告されてきたが、薬剤動態研究の結果により、迅速代謝型 (F) では不十分な治療によりイソニアジドの濃度が十分に上がらない可能性が強く疑われる。最近、迅速代謝型 (F) が治療失敗や薬剤耐性の獲得に関連するとの報告があるが (Pasipanodya JG, et al. Clin Infect Dis. 55:169-77, 2012.)、多剤耐性結核と NAT2 遺伝子型との関連解析については十分な報告が無く、今後、さらに検討を進める必要がある。

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 血中濃度と正の相関を示し、IL12 鎖 (p35) 遺伝子発現と負の相関を示した。

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った。また別の Th1 系遺伝子である IL12 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。

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。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IL12RB1mRNA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た。

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。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。

この3年間、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、長い共同研究の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

抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子 NAT2、結核自然免疫に関連する MBL2、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 の遺伝子多型がそれぞれ、多剤耐性結核の異なる局面に影響を与える可能性を明らかにすることができた。

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、今後も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 Respirology, 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.
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, 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.
- 8 . 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.

G . 知的財産権の出願・登録状況