

表 3

<p>調査票（新しい抗結核剤使用）</p> <p>(1) リファブチン投与症例について 結核患者（多剤耐性結核患者）にリファブチンと治療投与</p> <p>(2) リネゾリド linezolid (LZD) 投与症例について                      ザイボックス (Zyvox)</p> <p>(3) メロペネム - クラブラン酸 投与症例について</p> <p>(4) リファペンチン (Priftin)</p> <p>(5) モキシフロキサシン (MFLX)</p> <p>[I] リファブチン</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・リファブチン (RBT, rifabutin) はリファンピシン (RFP, rifampicin) と同じリファマイシン系抗生物質であるが、RFP と比べて薬剤相互作用が弱く、抗ウイルス剤を投与している HIV 感染者に対しても併用が可能です。</li> <li>・平成 20 年 7 月、国内において RBT が抗結核薬として承認されたことから、副作用や多剤耐性結核 (MDR-TB) のために RFP が使用できない患者に対して RBT の使用が期待されます。</li> <li>・したがって、貴施設ですでにリファブチン投与された結核症例について、その効果、副作用、投与症例について調査票で調査を致したく存じます。</li> </ul> <p>[II] リネゾリド</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・リネゾリド (LZD, linezolid) は MRSA、特にバンコマイシン耐性菌に適用がありますが、最近 MDR-TB に対しても使用され有効例が国内外の論文・学会で発表されつつあります。</li> <li>・したがって、貴施設ですでにリネゾリド投与された結核症例について、その効果、副作用、投与症例について調査票で調査を致したく存じます。</li> </ul> <p>[III] メロペネム - クラブラン酸</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・メロペネム (MEPM, meropenem) は <math>\beta</math> - ラクタマーゼ阻害剤のクラブラン酸 (Clavulanate) を併用投与すると、MDR-TB に有効 (vitro) の報告が Science (2009) に発表されました。</li> <li>・したがって、貴施設ですでにメロペネム - クラブラン酸投与された結核症例について、その効果、副作用、投与症例について調査票で調査を致したく存じます。</li> </ul> <p>[IV] リファペンチン (Rifapentine)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・(Priftin) 1 週に 2 回投与でよい。</li> </ul> <p>[V] モキシフロキサシン (MFLX)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・アベロックス (Avelox)</li> </ul> <p>WHO Stop TB パートナーシップの Global TB Drug パイプラインでは第 III 相試験中。</p>
---

表 4

結核新化学療法を含めた治療方式の 開発・評価： 調査票(新しい結核治療剤使用)		
<b>全国結核診療施設 259施設</b>		
調査票送付	259施設	
回答	129施設	
回答率	49.8%	
回答	施設数	回答施設
国立病院機構	52 施設	32 施設
他の結核診療施設	207	97
合計	259	129

表 5

調査票(新しい結核治療剤使用)	
1. リファブチン	39症例
2. リネゾリド	27症例
3. メロペネム クラブラン酸	2症例
4. リファペンチン	0症例
5. モキシフロキサシン	16症例
合計	84症例

表 6

リファブチン(39症例)効果			
有効	33例	84.6%	
無効	5例	12.8%	

		有効	無効	
MDR-TB	13例	7例	5例	(53.8%に有効)
RFPのみ耐性	0例			
INHのみ耐性	1例	1例	0例	
耐性なし	21例	20例	0例	

表7

リネゾリド(27症例)効果			
有効	24例	88.9%	
無効	1例	3.7%	

		有効	無効	
MDR-TB	24例	22例	1例	(91.7%に有効)
RFPのみ耐性	0例			
INHのみ耐性	0例			
耐性なし(糖尿病)	1例			

表8

メロペネム - クラブラン酸(2症例)効果		
有効	2例	100.0%
無効	0例	0.0%
リファペンチン(0症例)効果		

表9

モキシフロキサシン(16症例)効果				
有効	11例	68.8%		
無効	1例	6.3%		
MDR-TB	6例	3例	1例	(50%に有効)
RFPのみ耐性	0例			
INHのみ耐性	1例	1例	0例	
耐性なし	5例	5例	0例	(糖尿病1、慢性肝疾患1、胃切除後2)

表10

(39症例投与)

<b>リファブチン副作用</b> (16症例:複数回答)	
---------------------------------	--

① 白血球減少症	4例
② 血小板・汎血球減少症	1例
③ 貧血	3例
④ 肝機能異常	4例
⑤ その他	4例

(内訳:食欲不振3例、  
記入なし1例)

表11

(27症例投与)

<b>リネゾリド副作用</b> (8症例:複数回答)	
-------------------------------	--

① 骨髄抑制	2例
② 視神経症	0例
③ ショック	1例
④ その他	5例

(内訳:下痢1例、神経炎1例、  
聴力の低下、手足のしびれ1例、  
発疹1例、記入なし1例)

表12

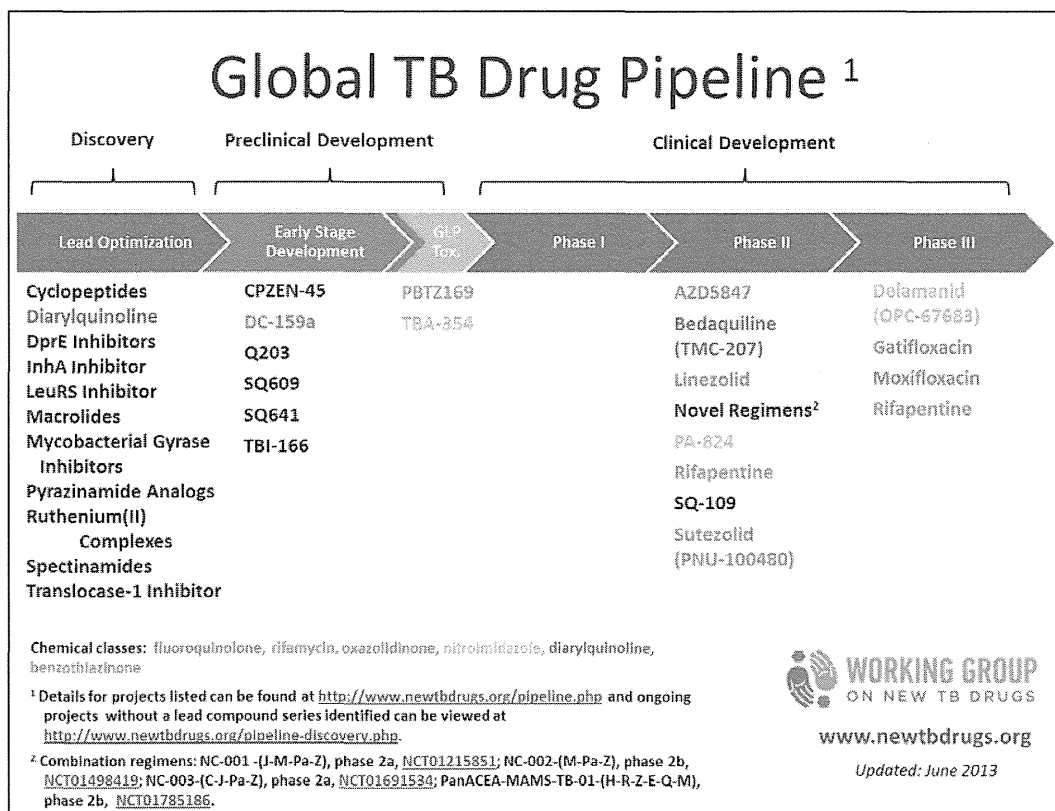
		(2症例投与)
<b>メロペネム - クラブラン酸 副作用</b>		
<b>(0症例)</b>		
① 急性腎不全	0例	
② その他	0例	

表13

		(16症例投与)
<b>モキシフロキサシン副作用</b>		
<b>(1症例)</b>		
① 不整脈	0例	
② アナフェラキシーショック	0例	
③ その他	1例	
		(内訳: 記入なし1例)

[ II ] 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

図1



1. 新しく開発された抗結核剤として、図1に示したが如く、デラマニド (Delamanid: OPC67683)、ベダキリン、カプラザマイシン (CPZEN-45) 等が有効であり、特にデラマニド (図2) に大きな期待が寄せられる。

すでにデラマニドに関しては我々は表14の如く、多剤耐性結核や感染力の強いスーパー・スプレッダー (S・S) 多剤耐性結核に対する治療効果 (マウス) をICAACの学会等に発表してきた。

図2

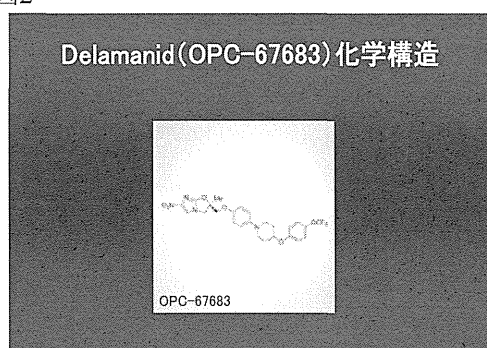


表14

### [ 現在までの結果 ]

Delamanid (OPC67683) を用いた結核治療効果

- ① 新規治療剤 Delamanid の多剤耐性結核や感染力の強いスーパー・スプレッダー (S・S) 多剤耐性結核に対する治療効果 (マウス)。AIDSモデルマウスで結核治療効果。
- ② Delamanid のヒト多剤耐性結核患者第 II b 相臨床試験を終了。

表15

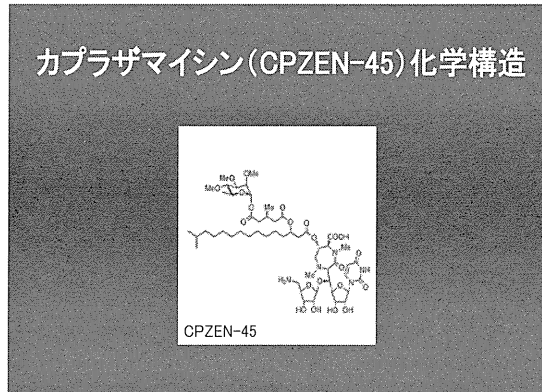
Synergistic therapeutic effect of the combination of (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) vaccine and chemotherapy (Delamanid) on TB infection.

Group	N	H37Rv Intratracheal Inf. 1000CFU/mouse	Therapy
G1	6	+	(-)
G2	6	+	HSP65+IL-12DNA
G3	6	+	Delamanid 0.0078mg/mouse
G4	6	+	Delamanid 0.03125mg/mouse
G5	6	+	Delamanid 0.125mg/mouse
G6	6	+	HSP65+IL-12DNA + Delamanid 0.0078mg/mouse
G7	6	+	HSP65+IL-12DNA + Delamanid 0.03125mg/mouse
G8	6	+	HSP65+IL-12DNA + Delamanid 0.125mg/mouse
G9	6	+	(-)
G10	6	(-)	(-)

さらに、現在表15のように、デラマニド+HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの相乗的抗結核治療効果を解析中である。

## 2. カプラザマイシンの抗結核効果

図3



カプラザマイシン(CPZEN-45)の化学構造は図3に示した如くであり、CPZEN-45がWHOのStop TBのCurrent Global TB Drugパイプラインにpreclinical drugとしてノミネートされた。

現在までの結果を表16に示した。

表16

**〔現在までの結果〕**

カプラザマイシン(CPZEN-45)はpreclinical drug。

- ① XDR-TB(超薬剤耐性結核)に対し治療効果(マウス)。
- ② INH+RFP治療法とカプラザマイシンは相乗的結核治療効果。
- ③ CPZEN-45+新規結核治療ワクチン(HSP65+IL-12DNA)併用治療にて結核治療相乗効果。T細胞増殖の相乗効果。IL-6産生に対する相乗効果。
- ④ 我々が特許を取得中のCPZEN-45がWHO Stop TBのCurrent Global TB Drugパイプラインにpreclinical drugとしてノミネートされた。

すなわち①XDR-TB(超薬剤耐性結核)に対し治療効果(マウス)、②INH+RFP治療法とカプラザマイシンは相乗的結核治

療効果、③CPZEN-45+新規結核治療ワクチン(HSP65+IL-12DNA)併用治療にて結核治療相乗効果。T細胞増殖の相乗効果。IL-6産生に対する相乗効果、を示唆する予備実験結果を得た。

CPZEN-45はマウスの系でT細胞免疫を増強する結果を得たことより、正式に表17の実験を計画している。

表17

**新規化学療法剤(カプラザマイシンCPZEN-45)とHVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12 DNAワクチンとの結核治療相乗効果**

グループ	N	H37Rv感染	治療
G1	6	+	(-)
G2	6	+	CPZEN HSP65 + IL-12 DNA
G3	6	+	CPZEN
G4	6	+	HSP65 + IL-12 DNA
G5	6	+	(-)
G6	6	(-)	

〔Ⅲ〕患者血清中のGranulysinやKsp37による慢性排菌や再発の予後診断法開発  
研究協力者及び国立病院機構65施設の呼吸器ネットワーク共同研究グループを活用して研究を行った。(表18、表19)

表18

**〔Ⅱ〕患者血清中のGranulysinやKsp37による慢性排菌や再発の予後診断法開発**

1. 多剤耐性結核患者の血清中及び患者リンパ球を結核抗原で刺激した培養上清のGranulysin、Ksp37をELISA法を用いて測定する。
2. 結核重症度、難治性の関連を解析する。
3. 研究協力者
  - ・NHO呼吸器疾患研究ネットワークグループ
  - ・複十字病院
  - 等との共同研究





2. さらに、キラーT細胞から産生されるKsp37蛋白 (killer-specific secretory protein 37kDa) が結核患者の血清中で有意に低下していることを発見した。これを用いた新しい細胞免疫診断法の確立を行っている。

図8

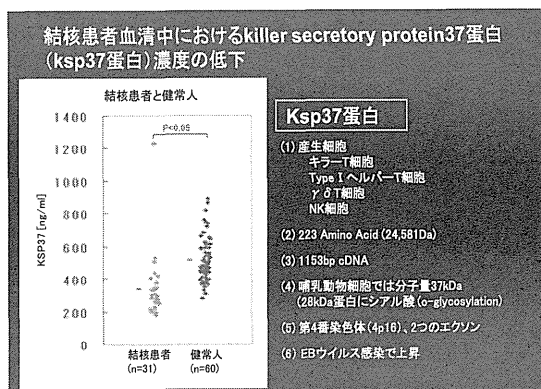


図8に示した如く、KSP37蛋白はキラーT細胞、Type I ヘルパーT細胞、 $\gamma\delta$  T細胞、NK細胞から産生される蛋白である。KSP37蛋白は223個のアミノ酸よりなる分子量24,581Daの分子である。KSP37遺伝子は1153bp cDNAによりコードされる。哺乳動物細胞では分子量37kDaのKSP37蛋白となる。それは、28kDa蛋白にシアル酸 (o-glycosylation) が結合するからである。第4番染色体 (4p16) にKSP37遺伝子が存在し、2つのエクソンよりなる。KSP37蛋白の生理学的な活性は不明であり、EBウイルス感染でヒト血液中のKSP37蛋白が上昇することが言われている。しかしその機能は不明である。ある種のヒト卵巣癌やある種のヒト gliomaでKSP37の発現が報告されており、発症している癌は予後が良いタイプが示唆されているか、不詳である。このようにKSP37の生理学的機能、免疫学的機能、

結核に対する役割は全く不明である。

一方、キラーT細胞はヒトのchronicな結核感染に対する抵抗性の免疫担当細胞として最も重要なリンパ球であることが世界的なコンセンサスである。このキラーT細胞からKSP37が分泌されることより、我々は結核患者血清中のKSP37を測定して、健康人のKSP37の値と比較検討した。結核患者31例及び健康人60例の血清中におけるKSP37蛋白濃度を測定した。その結果結核患者の血清中のKSP37濃度は200ng/ml～500ng/mlであった。一方健康人の血清中のKSP37濃度は300ng/ml～900ng/mlであった。すなわち、結核患者では健康人に比較して血清中のKSP37濃度の低下が認められた。(p<0.05)。

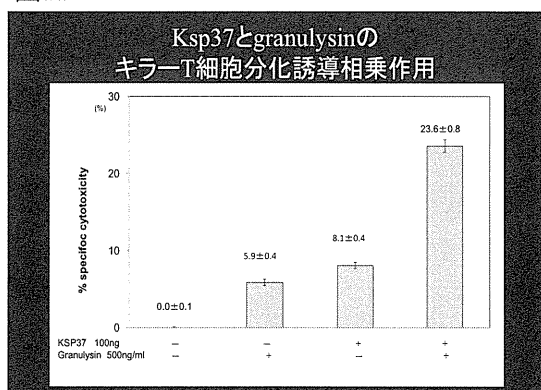
これらの結果よりKSP37蛋白は結核免疫 (抵抗性) になんらかの関与をしていることが示唆された。

3. したがって、次にリコンビナントKSP37蛋白の作製とこれを用いた、免疫応答調節機構を解析した。リコンビナントKSP37をin vitroの系に加えてキラーT分化誘導活性を測定し、キラーT細胞誘導活性を示した。さらに、このリコンビナントKSP37はIL-2の産生増強効果、IFN- $\gamma$ の産生増強効果、ならびにIL-6の産生増強効果を発揮した。我々の一連の研究より、IL-6、IL-2及びIFN- $\gamma$ はキラーT細胞分化因子として作用することを世界に先駆けて明らかにしたが、KSP37のキラーT細胞分化誘導活性とIL-6、IL-2及びIFN- $\gamma$ 産生増強作用は、結核免疫 (抵抗性) にとって重要な機能をKSP37が有す

ることが示され、極めて興味深い結果を得た(図11)。

さらに、KSP37 transgenicマウスを作製して抗結核効果を生体内で発揮する可否かを解析した。その結果、KSP37 transgenicマウスにヒト結核菌H37Rvを静注した場合、正常マウスに比較して結核菌の増殖を抑制した。すなわちKSP37は生体内抗結核作用を有することが示唆された。

図11



#### D. 考察

1. 「新化学療法剤を含めた治療方式の開発と臨床応用：調査票（新しい結核治療剤使用）」を全国結核診療施設（259施設）に送付し、調査を行った。新しい抗結核薬リファブチン及びリネゾリド、メロペネム-クラブラン酸の三種の新しい化学療法剤の投与症例数、多剤耐性結核に対する有効性、副作用等を調査。リファブチンはMDR-TBの耐性結核患者の53.8%に有効。リネゾリドは91.7%に有効。
2. 新薬（デラマニド等）が認可されれば、下記の方法と組み合わせて極めて強力な多剤耐性結核に対する新しい治療法

が確立できる。マウスの系で強力な治療効果。現在、新規結核治療ワクチンと相乗的治療効果解析中。

3. カプラザマイシンはXDR-TBに治療効果（マウスの系）を示し、INH+RFP治療法と相乗的治療効果を示したことより、結核のみならず、MDR-TBやXDR-TBに対して治療期間短縮やファースト・ライン抗結核剤の投与量を減少させることが期待できる。

さらに、カプラザマイシンは新規結核治療ワクチンと相乗的治療効果を発揮したが、これはカプラザマイシン自身が単独でキラーT細胞活性やサイトカイン産生等、結核菌に対する細胞性免疫を増強する作用を示すことより、ワクチンと相乗的な治療効果が発揮されたことが示唆された。

4. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 結核の短期治療、MDR-TBの新しい治療法開発で医療費においても厚生行政に大きく寄与。
- (2) 結核患者のQOL向上となる。
- (3) 結核患者血清中のgranulysinや、Ksp37は結核の重症度につれ低下し、結核免疫に相関することから、慢性排菌や再発の予後診断となり、治療方針の決定に大きく貢献する。

5. 今後の課題

- (1) 多剤耐性結核患者及び慢性排菌結核患者のデラマニド（OPC67683）治療。
- (2) 現在の結核標準治療のINHの代わり

にデラマニドを用いて解析する。

(3) デラマニドの臨床応用認可が下りるまで動物実験

① デラマニドと他の新規抗結核剤や結核治療ワクチンとの相乗的治療効果の解明

② カプラザマイシン (CPZEN-45)

(4) 細胞性免疫予後診断法(granulysin、KSP37)の開発・臨床応用。

## E. 結論

1. 新化学療法剤を含めた治療方法の開発と臨床応用

(1) 「調査票(新しい結核治療剤使用)」を全国結核診療施設 (259 施設) に送付し、調査。

① リネゾリドは多剤耐性結核 (MDR-TB) の 91.7%に有効。切れ味良い。副作用：末梢神経障害、骨髄抑制。

② モキシフロキサシンは MDR-TB の 50.0%に有効

③ リファブチンは MDR-TB の 53.8%に有効

(2) 開発中新薬

① デラマニド：MDR-TB 治療効果。AIDS モデルマウスで結核治療効果

② カプラザマイシン：XDR-TB (超薬剤耐性結核) 治療効果 (マウス)。INH + RFP 治療法と相乗効果

2. 患者血清中の Granulysin や KSP37 等に

よる慢性排菌や再発の予後診断法開発

(1) MDR-TB 患者や難治性 (糖尿病合併等) 結核患者では CD8 陽性 T 細胞からの結核菌殺傷タンパク granulysin 産生低下が著明。

血清中granulysinも健常人に比較し、再発性結核患者で低下。結核剤治療で血清granulysin正常化。

(2) CD8 陽性キラーT 細胞から産生される KSP37 (Killer Specific secretory protein of 37kDa 蛋白)の血清中濃度は結核患者で健常人に比較し、低下。

(3) granulysinとKSP37はキラーT細胞分化相乗効果

F. 健康危険情報なし。

## G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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 Vaccines and Immunotherapeutics:9(3)515-525.2013.

- (2) 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 Vaccines and immunotherapeutics:9(3)526-533.2013

俊洋, 金田安史, 高森靖, 岡田全司. granulysinワクチン及びksp37ワクチンとキラーT細胞分化作用. 平成25年結核病学会・呼吸器学会近畿地方会 (大阪) 2013.7月

## 2. 学会発表

- (1) 喜多洋子, 橋元里実, 林清二, 岡田全司. 結核患者血清中及び末梢血リンパ球から産生される Granulysin や Ksp37 等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 平成 25 年結核病学会総会 (千葉) 2013.3 月
- (2) 喜多洋子, 橋元里実, 林清二, 岡田全司. 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) と他の薬剤・ワクチンとの相乗効果及びキラーT細胞分化. 平成25年結核病学会総会 (千葉) 2013.3月
- (3) 西松志保, 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 西田泰子, 林清二, 岡田全司, 高森靖. 患者血清中のGranulysinやKsp37等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 平成25年日本呼吸器学会 (東京) 2013.4月
- (4) 西松志保, 喜多洋子, 橋元里実, 仲谷均, 木岡由美子, 高見泰子, 林清二, 中島

結核の病態に関連する新規遺伝子/タンパク発現制御マーカーの探索

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・部長  
研究協力者 土方美奈子（同・病理科長）

研究要旨

マイクロ RNA (miRNA) は、標的となる遺伝子の発現を動的に制御することにより、様々な疾患と関わる事が知られ、ここ数年、感染免疫病態の指標としても注目されている。本年度は、IFN $\gamma$  遊離試験で LTBI ありと判断された医療従事者 41 名、LTBI なしと判断された 68 名の全血由来の total RNA を得て、特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA 発現量をリアルタイム RT/PCR 法で定量し、相関解析を行なった。その結果、LTBI 群では miR-223 と IFN $\gamma$  遺伝子(*IFNG*) mRNA, miR-421 とインターロイキン 2 遺伝子(*IL2*) mRNA の相対発現量がそれぞれ負の相関を示していた。これらの miRNA が LTBI における宿主免疫応答を修飾している可能性が考えられたが、非 LTBI 群ではこのような負の相関はみられなかった事から、LTBI における末梢血中の免疫細胞の遺伝子発現制御は健常状態とは異なるものと示唆された。また活動性結核患者ではこのような相関は見られず、LTBI 群でみられる生体内での軽微なサイトカイン応答をこれら miRNA が制御している可能性が考えられた。結核の感染・発病に関わる宿主要因の評価・解明を行うことにより、新たな遺伝子/蛋白発現制御マーカーが発見され、結核対策に応用されることが期待される。

A. 研究目的

世界の人口の 3 分の 1 が結核菌に感染し、結核の年間の新規発症者数は 860 万人と推定されている(2012 年)。結核の感染・発病は病原体である結核菌の性質と、結核菌に対する宿主の免疫防御能、さらに環境要因による影響を考慮する必要がある。感染の成立後、発病に到るまでの期間は、潜在性結核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) の状態にあり、最終的に約 5-10%の感染者のみが発病する。この過程には個人差が大きく、結核菌と宿主反応の相互作用が深く関わっているものと推測されている。宿主の個体差による免疫防御能の違いを解明し、結核菌の感染あるいは感染から発症への高危

険群の同定に関連する新規指標 (バイオマーカー) となる宿主側の因子を明らかにすることは結核対策に大きく貢献する可能性がある。

マイクロ RNA (miRNA) は動植物に存在する 20 塩基長程度の蛋白質をコードしない small RNA で、標的遺伝子の蛋白発現を動的に制御することが知られており、近年、癌を始め、様々な疾患でバイオマーカーとして注目されている。miRNA はメッセンジャー RNA (mRNA) と同様に RNA polymerase II によりゲノムから転写された後に、miRNA 特有のプロセッシングを経て、特定の蛋白と結合して RNA-蛋白質複合体を形成し、標的となる遺伝子 mRNA の主に 3' 非翻訳領域の相補的な配列部分に結合する。

miRNA が結合した mRNA は、翻訳阻害による蛋白発現量低下ないし mRNA の安定性の変化による mRNA 量の低下により、遺伝子発現量の調整を受ける。最新のデータベース(miRBase 20)によると、ヒトでは現在までに1,872種類の miRNA が登録されている。miRNA による遺伝子発現の制御の特徴は、相補的に mRNA と結合する配列の長さが短く、ひとつの miRNA がいくつもの mRNA に結合することができ、逆にひとつの mRNA にいくつもの miRNA が結合することができるという機能的柔軟性と、エクソソームに包まれ、あるいは蛋白質と結合して細胞から体液中に分泌され、遠隔の細胞にとりこまれてそこで遺伝子発現を調節することのできる時空間的柔軟性の2点が指摘できる。感染症分野において、感染免疫病態の指標として miRNA が持つ役割の研究はまだ始まったばかりであり、特に結核では miRNA の研究はまだ数が少なく、一定の結論は得られていない。

本研究では今年度、LTBIにおける全血中の miRNA と免疫関連遺伝子の発現解析による宿主の結核免疫応答の検討を通じ、宿主応答の個体差に関する適切な新規指標(バイオマーカー)を見出し、結核発病高危険群の同定を含め、結核免疫病態の解明に貢献することを目的とする。

## B. 研究方法

ベトナム ハノイ市における国際共同研究の一環として本研究を行った。

(倫理面への配慮: 事前に研究計画書は、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除などを含む研究内容の説明を行った上で、研究への同意を書面で得た。)

109名の研究参加者のうち、インターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ )遊離試験でLTBIありと判断された医療従事者41名、LTBIなしと判断された68名について、採血直後にRNA安定化剤を付加して凍結保存した全血より total RNA を抽出し、研究に使用した。

miRNA の定量的 RT-PCR 解析は、miScript II RT Kit (QIAGEN)を用いて polyA 付加反応と逆転写反応を同時に行った上で、miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)と miScript Primer Assays (QIAGEN)を用いてリアルタイムPCRを行った。ターゲットとして測定する miRNA としては、結核における miRNA 発現網羅解析の報告 (Wang C, *et al.* PLoS ONE 6:e25832, 2011. Maertzdorf J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 109:7853-8, 2012. など) のうち、複数で関連が示されている10個の miRNA (hsa-miR-144, hsa-miR-155, hsa-miR-21, hsa-miR-181b, hsa-miR-223, hsa-miR-744, hsa-miR-421, hsa-miR-182, hsa-miR-660, hsa-miR-28-3p) を選び、サンプル間の発現量の比較のためのコントロールには、RNU6-2, SNORD68, SNORD95, hsa-miR-103, hsa-miR-191 の5つの平均 Cq 値を用いた。それぞれの PCR 系の増幅については、Tm 値の確認を行い、予想される Tm 値の範囲からはずれたものについては増幅されていないと判断した。また、全血より抽出した total RNA を SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)と random nonamer で逆転写し、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム RT-PCR 解析系にて、細胞性免疫に関わる代表的な遺伝子群 (*GZMB*, *PRF1*, *GZMB*, *STAT1*, *STAT4*, *STAT6*, *CXCL10*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL12A*, *SPPI1*, *IL2*, *IL10*, *TGFB1*, *IL23A*, *TNF*, *LTA*, *IL15*, *IL18*, *FOXP3*, *TBX21*, *GATA3*,

*HIF1A, IL4, RORC*)のmRNA発現量を測定した。コントロールとしては、*GAPDH*を用いた。各miRNA 相対発現量と細胞性免疫関連遺伝子群(28 遺伝子)のmRNA 相対発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法により求め、発現量について Spearman の順位相関係数を算出した。

### C. 研究結果

全血中の miRNA, 免疫関連分子の遺伝子の各発現パターンについて、順位相関係数を算出した結果、LTBI 群では、miR-223 と *IFN $\gamma$*  遺伝子(*IFNG*) mRNA の発現量 (Spearman の順位相関係数 =  $-0.671, P < 0.0001$ )、および miR-421 とインターロイキン2 遺伝子 (*IL2*) mRNA の発現量 (Spearman の順位相関係数 =  $-0.608, P < 0.0001$ ) が、それぞれ負の相関を示していた。しかし、非 LTBI 群では関連がみられなかった。LTBI 群において、年齢と性別を調節した偏相関係数は、miR-223 と *IFNG* mRNA が $-0.4056$  (図 1)、miR-421 と *IL2* mRNA が $-0.5356$  (図 2) であった。また、LTBI 群と非 LTBI 群の間で、miR-223, miR-421, *IFNG*, *IL2* の発現量には有意な差が見られなかった。

図1 *IFNG* mRNAとmiR-223発現量の負の相関

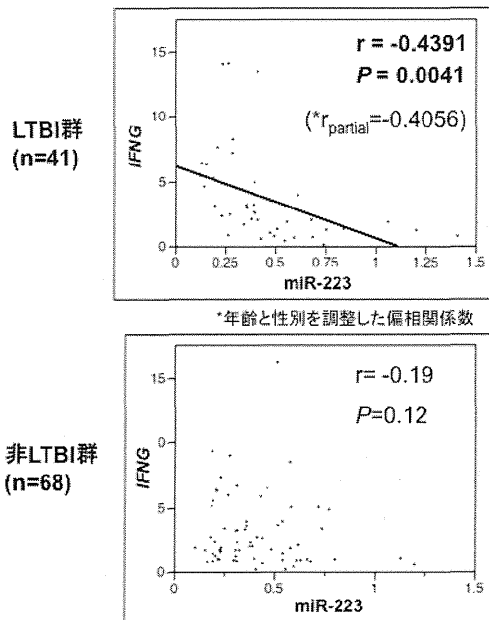
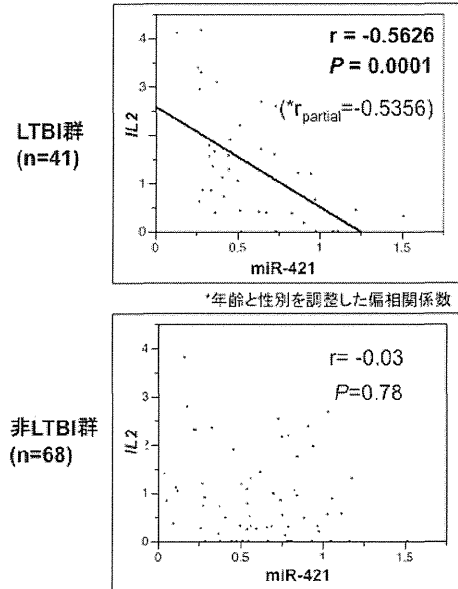


図2 *IL2* mRNAとmiR-421発現量の負の相関



### D. 考察

結核菌をはじめとする抗酸菌感染症に対する宿主側の細胞性免疫応答関連分子の中で、Th1 細胞系より産生される *IFN $\gamma$*  はその中心的な役割を担っているサイトカインと考えられている。また、*IL-2* は抗原によって活性化された T 細胞から分泌され、T 細胞の増殖や分化に関連し、エフェクター T 細胞やメモリー T 細胞の維持など、抗結核免疫における重要性が広く認識されている。LTBI 群の血液中において特定の miRNA 発現量がこれらの mRNA 発現と負の相関を示したことは、miRNA による抗結核免疫の制御が生体内で見られる可能性を示している。

miR-223 は癌、感染症、炎症領域で既に様々な役割が報告されている miRNA であり (Haneklaus M, *et al. J Intern Med* 274:215-226, 2013)、顆粒球での発現が主体とされる一方で、単球・マクロファージ系でも *IKK $\alpha$*  の直接的な発現抑制による NF $\kappa$ B 制御 (Li T, *et al. Nat Immunol* 11:799-805, 2010) など、炎症シグナル伝



達系を介した免疫制御機能が知られている。  
miR-421 について免疫関連遺伝子発現調節機構を実験的に証明した報告はまだなされていないが、miRNA-mRNA の結合予測プログラムの一つである miRANDA (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) による解析結果からは、*IL2* 遺伝子と *IL2* 受容体  $\gamma$  鎖遺伝子 (*IL2RG*) の 3' 非翻訳領域に miR-421 結合配列の存在が予測された。miRNA-mRNA の相補的結合に最も強く関わるシード配列は短く、結合予測プログラムによっては異なる結果が導かれる場合もあるが、miR-421 と *IL2RG* の組み合わせは、他の動物種との保存性を考慮に入れた別のプログラムである TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) においても、miR-421 結合性が予測されたため、*IL2RG* mRNA 発現がこの機序により調節されている可能性が高いものと考えられた。

今回の全血を用いての検討では、LTBI 群と非 LTBI 群の間で、miR-223, miR-421 の発現量自体に有意差は見られなかった。miR-223, miR-421 とともに X 染色体上に存在し、miR-223 は独自のプロモーターから転写調節を受けることが知られているのに対し、miR-421 は、別の転写調節に関わる non-coding RNA (FTX) のイントロン領域に他のいくつかの miRNA と共に存在しており、それぞれの転写調節機構と免疫系との関連についてはまだ解明されていない。Th1 系細胞における各 miRNA 発現がターゲットの mRNA 発現制御に関わる可能性、あるいは遠隔の細胞由来の miRNA が Th1 細胞に取り込まれて発現制御する可能性など、今後さらに検討を要する。

今回の結果より、miRNA が LTBI における宿主免疫応答を修飾している可能性が考えられたが、非 LTBI 群ではこのような相関はみられな

かったため、LTBI における末梢血中の免疫細胞の遺伝子発現制御は健常状態と異なると示唆された。また平成 24 年度に検討した活動性結核患者でも相関は見られず、LTBI 群でみられる生体内での軽微なサイトカイン応答を miRNA が制御しているのではないかと考えられる。最近 IFN- $\gamma$  と IL-2 の発現パターンによる CD4<sup>+</sup> T 細胞サブセットの割合が LTBI や結核の治療経過において病態を反映する可能性が示唆されているため、今後、結核治療経過に伴う *IFNG*, *IL2* mRNA 発現量の変化とこれら miRNA 発現量との関連についても検討する予定である。

## E. 結論

IFN $\gamma$  遊離試験で LTBI の状態を推定した 109 名の医療従事者の全血より total RNA を得て、特定の miRNA と細胞性免疫関連遺伝子群の mRNA の発現量をリアルタイム RT/PCR 法で定量し、相関解析を行なった。その結果、LTBI 群では miR-223 と *IFNG* mRNA, miR-421 と *IL2* mRNA がそれぞれ負の相関を示し、これらの miRNA が LTBI 群に特有な軽微な免疫炎症応答を制御している可能性が考えられた。今後、このような観点から、新規遺伝子/蛋白発現制御マーカー探索が開発され、結核対策に応用されることが期待される。

## 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. Yen NTB, Hijikata M, Matsushita k, Hang NTL, Hong NT, Lan NN, Dung NH, Keicho N. Circulating adipokines and immune-gene expression levels in patients with multidrug-resistant tuberculosis. In: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20-22, Sendai, Japan, 2014.

G 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)なし

## 研究要旨

### 1. 平成 24 年度コッホ現象事例報告書を対象とした解析

①BCG ワクチン接種後のコッホ現象例の推移を明らかにする、②コッホ現象が疑われた例への対応上の課題を明らかにする、などを目的に、平成 24 年 1 月～12 月の BCG ワクチン接種後に市町村・都道府県を通じて厚生労働省結核感染症課に報告されたコッホ現象事例報告書全例を対象に報告書内容を分析し、以下に示す結果が得られた。

- ・報告された事例報告書は 147 例であったが、このうち 43 例は報告書が提出された時点で結核未感染と判断されていた例であり、また 34 例は最終的な感染判断或いは事後対応方針が不明確な例であった。

- ・適切な時期に実施したツ反が「陽性」であった 40 例のうち、26 例では結核既感染例と判断され、発病に関する画像検査が適用され、1 例で発病治療が、25 例で発病予防を目的とした治療（LTBI 治療）が開始されていた。また、ツ反が「陰性」であった 1 例についても接種局所所見の推移より既感染の可能性が強く疑われ、発病予防を目的とした治療が開始された。BCG ワクチン接種後早期の接種部位局所変化出現を契機に結核既感染と診断された児は計 27 例で、加藤らによる 2005 年～2009 年の報告例の集計（年間 22～28 例で変動）とほぼ同様の例数であり、また出生人口 10 万対の例数も同様であった（2005～2009 年 2.5/出生 10 万、2012 年も 2.6/出生 10 万）。東京 5 例、大阪 3 例、福岡 3 例、愛知 2 例など小児結核発病例と同様に大都市圏で多い傾向が確認された。

- ・一方で、ツ反が「陽性」であった 40 例のうち 9 例では発病予防を目的とした治療は適用されずに「経過観察」とされていた。

- ・結核発病例（1 例）も含め、既感染例と判断された 27 例で、報告書が提出された時点において児にとっての感染源が特定されたケースは認めなかった。

「コッホ現象事例報告書」提出の目的及び対象を明確にした上で、コッホ現象が疑われた例における感染・発病診断検査データの集積、精査対象例のその後の発病の有無に関する前向き追跡、ツ反、IGRA に代わって/或いは追加して利用できる鋭敏な感染診断法導入に向けた検討（例えば、結核菌特異抗原刺激に伴う IP-10 release assay）が必要と思われる。

## 2. 小児を対象とした結核感染診断における QFT-GIT 及び T-SPOT TB 反応性の比較

### -第2報-

近年新たに導入された 2 種類の IGRA (IFN-に導入された核感染診断における)、即ち、QFT-GIT (QunatiFERON TB Gold In-Tube,商品名 クオンティフェロン®TB ゴールド) 及び、T-SPOT. ®TB (商品名 T-スポット. ®TB ) の小児を対象とした結核感染診断におけるパフォーマンスに関する検討を目的に、2010 年 3 月以降 2013 年 12 月までに当院において結核感染診断を目的に 2 種の IGRA を同時に適用した小児例を対象にその症例背景及び判定結果について後方視的な検討を行った。その結果、①QFT-G から QFT-GIT への変更に伴って乳幼児「判定不可」例が有意に減少した、②小児を対象とした QFT-GIT 及び T-SPOT の判定結果乖離例は年齢によらず非常に少数例であった、③発病例を対象としては QFT-G と同様に良好な感度を認めた、④BCG 接種後局所所見推移やツ反結果より「結核既感染例」と判断したコッホ現象例で発病例を除いて IGRA 陽性例は認めず、乳児未発病感染例 (≒LTBI 例) における感度不良が示唆された。

これまでの「QFT 使用指針」や「接触者健診のてびき (第 4 版)」では、QFT-G 適用小児例での検討結果を根拠として、5 歳未満の小児に対する QFT-G の適用は推奨されず、ツ反を優先して使用することが勧められてきたが、今回の検討結果及びこれまでに当研究班分担研究で集積された他の検討結果と併せ、乳幼児を含む接触者健診例やコッホ現象事例を対象に IGRA (QFT-GIT 及び T-SPOT) を積極的に適用することは発病例を見逃しを減らすために非常に有用な姿勢と考えられた。

## 3. 小児結核症例が集積する大都市部における小児結核に対する関心喚起・知識普及を目的とした研究—首都圏及び近畿小児結核症例検討会の継続的開催—

小児結核症例が特に集積する首都圏及び近畿地区の臨床・保健担当者を対象に小児結核に関する関心を喚起し、正確な知識を普及する機会として、また、発病に至った大都市地域の小児結核症例を抱える課題を詳細に検討して今後の小児結核対策に反映させることを目的に、首都圏 (第 4 回) 及び近畿地区 (第 11 回) での小児結核症例検討会を開催した。それぞれの症例検討会には 120 名以上の小児科臨床及び保健関係者が参加し、呈示された症例が抱える予防、診断、治療などに関する課題を共有する機会となった。今年度の呈示症例からは「コッホ現象」、「薬剤耐性結核」、「結核性髄膜炎」、「脆弱な家庭機能の支援」、「服薬支援」、「外国籍」、「診断の遅れ」、「患者発生後の疫学調査」、「小児結核医療体制」、「学校との連携」などの課題が抽出可能であった。

#### 研究協力者

森 亨 (結核予防会結核研究所)

加藤 誠也 (結核予防会結核研究所)

原田 登之 (免疫診断研究所)

樋口 一恵 (免疫診断研究所)

前田 秀雄 (東京都福祉保健局)

成田 友代 (東京都世田谷保健所)

森川 雪子 (東京都福祉保健局)