

201420028A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と

新規予防法・治療法の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と

新規予防法・治療法の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成27(2015)年3月

目 次

総括研究報告書：若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と新規予防法・治療法の開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価 牧野 正彦（国立感染症研究所）	9
分担研究報告書：結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索とその構造機能解析 柴山 恵吾（国立感染症研究所）	14
分担研究報告書：追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリーT 細胞の分化調節機構の解析 田村 敏生（国立感染症研究所）	19
分担研究報告書：結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチンへの応用 松本 壮吉（新潟大学大学院）	24
分担研究報告書：PD-1 経路のシグナル伝達制御による抗結核感染防御増強へのアプローチ 河村 伊久雄（京都大学大学院）	28
分担研究報告書：結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成メカニズムの解明 梅村 正幸（琉球大学）	32
研究成果の刊行に関する一覧表	38

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と
新規予防法・治療法の開発

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
総括研究報告書

若年及び高齢者の結核制御を目指した生体防御反応解明と新規予防法・治療法の開発

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

全人類の恐怖となっている結核の制御は、地球規模での厚生行政上の最重要課題の一つとなっている。その中で最も重要な課題は、現行の BCG に代わる信頼し得る初回免疫ワクチン及びブースターワクチンの開発と多剤耐性結核菌に有効に作用する新規薬剤の開発である。本研究班においては、結核発症予防法の確立に向けて、上記ワクチン開発及び将来展望を鑑み開発されたワクチンの改良に資する基盤を構築するための生体防御反応の解析、さらには新規抗結核薬の開発を行うことで、地球規模での厚生行政への貢献を果たすことを目的とした。新規初回免疫ワクチンの開発においては、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG を宿主 BCG として用い、抗原性因子 HSP70-MMP-II 融合遺伝子 PEST 配列を付して導入した BCG-PEST を作製・評価した。BCG-PEST は BCG-Tokyo に比し強いワクチン効果を有し、ワクチン効果は長期持続した。特に、現行の BCG-Tokyo 株ではその増殖を抑制できない日本人の結核患者起因菌の 70% を占める北京株結核菌の肺内増殖を 99% 抑制することが可能であった。実用化を念頭に置いた今後の開発研究が待たれる結果となった。ブースターワクチンの開発においては、高齢者の潜伏感染結核菌の再燃による発症を抑制することを目的として、CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を第一義として設定した。効率的にキラー T 細胞を誘導する因子として、CD4 陽性 T 細胞が産生する IL-17F を同定し、IL-17F は BCG 接種後のワクチン効果を増強する可能性が示唆された。また、経鼻粘膜接種により Th17 産生することが、BCG 接種により産生されたエフェクター T 細胞の肺内へのリクルートを増強する可能性を示し、さらに、潜伏感染結核菌を殺戮するために必要な治療的ワクチンの開発を目指し、潜伏感染結核菌の細菌学的・免疫学的性状解析を行い、潜伏感染結核菌は特殊な代謝経路を利用していることが明らかにされた。第 3 の目的である新規抗結核薬の開発においては、結核菌ヌクレオチド加リン酸分解酵素を標的とする新しい化合物が同定され、本化合物は結核菌の増殖を抑えることが可能であり、全く新しいタイプの薬剤の開発が可能となった。以上、総合的結核制御において大きな進展がなされた。

研究分担者

柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
松本 壮吉（新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授）
河村 伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）
梅村 正幸（琉球大学熱帯生物圏研究センター・生体防御学・准教授）

A. 研究目的

結核は代表的な慢性持続性細胞内寄生性感染症であり、結核菌に対する生体防御反応は T 細胞を中心として営まれていて、感染初期には CD4 陽性 T 細胞、慢性期には CD8 陽性 T 細胞が結核菌の増殖を抑制する上で重要な役割を果たしている。したがって、ワクチンにより結核菌の細胞感染を抑制することは不可能である。一般に、肺胞内は言わば免疫不全状態にあり、迅速に T 細胞を活性化することは難しく、経気道感染した結核菌に対する初回免疫反応が活性化するには数週間と長い時間を要する。そのため、増殖期に移行した結核菌の増殖活動を抑制するためには、生涯を通じて機能的メモリータイプ CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を維持する必要がある。現行の BCG-Tokyo ワクチン株は、未感作 CD4 陽性 T 細胞をある程度活性化できるものの、未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性化することはできず、また、結核菌と同様細胞内潜伏感染する特徴を有するため、ワクチンとしては決して十分と言える状況にはない。同時に、これらのことは結核に対する新規リコンビナント BCG の開発を困難にする要素でもあり、現実的に全世界的に見ても新しい BCG の開発に正面から取り組んでいる研究施設は非常に少なくなっている。その意味において当研究班は特異であり、かつ貴重な存在と言っても過言ではない。そのため、当研究班では新規リコンビナント BCG を開発し実用化に結びつけることを最大の目標として設定している。

また、日本における結核新規発症者は 60 歳以上が 60% を占めている。そのため、生後 5 ヶ月以内に接種した結核ワクチンの効果を 60 年以上持続させる必要があるが、それは困難を極める。T 細胞を主体としたメモリー機構において、終身免疫は不可能に近く、適宜ブースターワクチン接種によるメモリー機能の維持が求められる。そのため、ブースターワクチンの開発が将来的には必要不可欠となると予想されるが、ブースターワクチンの目的はメモリー T 細胞の機能維持にあることから、初回免疫ワクチン

とブースターワクチンはそのコンビネーションが重要となる。しかし、残念ながらメモリー T 細胞の機能維持に不可欠な要素は未だ明らかになっておらず、当研究班ではそうした理論背景を明確にすることも目標の一つとした。さらに、近年新しい抗結核薬が開発され脚光を浴びているが、本剤一つで全ての多剤耐性結核菌を制御することは簡単ではなく、第 2・第 3 の新規薬剤の開発が求められる。そのため、新規抗結核薬の開発も重要な柱の一つとして設定した。したがって、当研究班では初回免疫用リコンビナント BCG 及びブースターワクチンの開発ならびに新規薬剤の開発を最重要研究課題として設定した。さらに、ワクチンおよび薬剤開発を多方面から行うことを目的として、将来を鑑みこれらテーマに関連する基礎的研究も併せ行った。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核感染肺における IL-17 依存性肉芽腫形成機構の解析 (梅村)
2. 結核の発症に関わる分子の機能解析とワクチン開発への応用 (松本)
3. 結核発症予防に貢献する新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価 (牧野)
4. 追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリー T 細胞の分化調節機能の解析 (田村)
5. 免疫抑制経路のシグナル伝達制御による抗結核感染防御増殖法の開発 (河村)
6. 新規抗結核薬開発のための標的分子の探索と構造機能解析 (柴山)

B. 研究方法

1. C57BL/6 マウスに *Mycobacterium bovis* BCG を経気道的に感染させ、経時的に肺組織を採取した。Total RNA を精製した後、cDNA を合成し real-time RT-PCR で IL-17F の発現動態を調べた。さらに、IL-17F 産生細胞の局在を免疫染色法を用いて検索した (梅村)。
2. BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$ マウス、LyzM-Cre^{+/+} マウスおよび HIF-1 $\alpha^{fl/fl}$ -LyzM-Cre^{+/-} マウスに結核

- 菌 H37Rv を噴霧感染させ、結核菌肉芽腫において産生される宿主 hypoxia inducible factor 1 (HIF1) の結核病態における役割を検討した (松本)。
3. 現行のワクチン株 BCG-Tokyo の改良にあたり、*UreC* 遺伝子ノックアウトリコンビナント BCG に PEST-HSP70-MMP-II-PEST 融合遺伝子をプラスミド型で導入し BCG-PEST を作製した。正常健康者末梢リンパ球を用い、BCG-PEST の T 細胞活性化能を評価するとともに、C57BL/6 マウスを用いて、BCG-PEST のメモリー T 細胞産生能及び結核ワクチンとしての有用性を評価した (牧野)。
 4. エフェクターメモリー様細胞障害性 T 細胞 (CTL) の分化誘導に必要な樹状細胞の成熟化誘導における IL-17F のマウス生体内での役割及び追加免疫における IL-17F の効果を検討した (田村)。
 5. C57BL/6 マウスに BCG を皮下接種し、その 4 週間後に結核菌を経鼻感染させた。BCG で誘導される感染防御の制御機序を解析した (河村)。
 6. 結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素を標的としたドッキングシミュレーションの結果に基づき新規阻害剤をデザインし、その抗菌活性を市販の微量液体希釈法による最小阻止濃度 (MIC) 測定キットを一部改変して行った (柴山)。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解 (インフォームドコンセント) を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指

針に基づいて実施した。

C. 研究結果

1. IL-17F は結核菌感染肺では肉芽腫周辺の II 型肺胞上皮細胞で強く発現し、感染早期の防衛免疫に関与している可能性が示唆され、IL-17F と IL-17A との間には機能分担があると考えられた (梅村)。
2. Hypoxia inducible factor 1 (HIF1) は、結核菌感染マウス骨髄由来マクロファージより産生され、IFN- γ 刺激で産生誘導され感染結核菌の生体外排除を担う iNOS の産生に関与することを明らかにした (松本)。
3. BCG-PEST はヒト末梢血由来未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、同時にマウス生体内で *in vitro* 二次刺激に強く反応するメモリータイプ細胞を効率的に産生した。さらに、BCG-PEST をマウスにワクチンとして皮下接種すると、標準結核菌株 H37Rv のみならず臨床分離株 (北京株) 及び強毒株 (Erdman 株) の肺内増殖を強く抑制した。BCG-PEST のワクチン効果は 6 ヶ月以上持続した (牧野)。
4. Peptide-25 によるエフェクターメモリー様 CTL の活性増強には IL-17F が必須であり、IL-17F 産生を効果的に誘導することが BCG ワクチンに対するブースト効果を誘導する可能性が示唆された (田村)。
5. PD-1 シグナル経路はエフェクターおよびエフェクターメモリー T 細胞からの IFN- γ 産生を強く抑制した。しかし、セントラルメモリーからエフェクター T 細胞への分化制御には、PD-1 よりも Tim3 経路が重要な役割を果たしていた (河村)。
6. 結核菌新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素に対する新規阻害剤を 15 種同定した。本阻害剤の構造情報に基づいてドラッグデザインを行い、結核菌に対して抗菌活性を示す新規化合物を同定した。その最少発育阻止濃度は 32 μ

g/mlであった（柴山）。

D. 考察

日本人の結核の起因菌は北京株が70%以上を占めている。北京株は多剤耐性を獲得し易く、かつBCGワクチンが奏功しにくい菌株として知られている。そのため、日本における対結核厚生行政に貢献するためには、北京株結核菌の肺内増殖を有意に抑制し得る新規BCGワクチンを開発することにある。現在、世界のワクチン開発の主流はコンポーネントブースターワクチンの開発に注がれている。しかし、この分野で最先端を走るワクチンもマウスなど小動物を用いた解析では、BCG非投与マウスに対し3回接種し初めて現行BCGの1回接種と同程度のワクチン効果を有する程度である。日本の予防接種はスケジュール管理が難しいほどの頻りに多種類ワクチンの接種が求められるほどに過密になっており、結核ワクチンを3回行うことは極めて難しい。しかもその効果は限定的であり、こうした意味においても新しいBCGの開発及び実用化が強く求められる。

本研究班の本年度の最大の研究成果は、肺胞内での結核菌の増殖を1~5%にまで抑制することができるBCGの開発に成功したことである。本BCGは標準株のみならず、日本人に多い北京株（臨床分離株）、強毒株の増殖も抑制可能であり、マウスにおいてワクチン効果を6ヶ月以上持続した。特に、現行のBCG-Tokyoが北京株の増殖を抑制し得ないことを考えると、BCG-PESTが北京株の増殖を99%を抑制したことは特筆に値する。マウスの寿命を2年と仮定すると人間においては、およそ20年間はワクチン効果が期待できることになる。本BCGが結核ワクチンとして市場に出現するまでには、安全性等様々なハードルを確実にクリアすることが求められる。しかし、本BCGはウレアーゼ活性を欠いているため、現行のBCGに比しより容易にライソゾームで分解される可能性が高いこと、またBCG菌体で強発現している蛋白要素は全て安全性が確立されているBCGの中に存在するものであ

ることから、環境への排出の可能性は低く、そのためヒト-ヒト伝播の可能性も現行BCGに比し低いことが想定される。カルタヘナ法も遵守し得る遺伝子組換え体となっている。さらに、現行BCGはHIV-1感染者など細胞性免疫応答能が低下している宿主では、いわゆる「BCG病」の発症が懸念されているが、開発したBCGはウレアーゼ活性を欠くため生体内寿命はむしろ短い可能性が大きいと、この点も凌駕し得ると考えられる。信頼できる結核ワクチンとして一日も早い実用化が期待される。

追加免疫ワクチンの開発は、日本は世界に一步道を譲る形になっているが、当研究班の研究成果として、CD8陽性キラーT細胞を標的とした時はIL-17Fが必須であること、また、経鼻粘膜ブースターワクチン接種によりTh17細胞を産生すると初回免疫ワクチンで産生されたエフェクターメモリーT細胞を効率に肺内へリクルートすることが可能であることを示唆した。全世界的にこうした研究はなされておらず、今後新しい観点からの追加免疫ワクチンが誕生するものと期待される。また、新規薬剤開発においては、結核菌のヌクレオチド加リン酸分解酵素を標的として、結核菌の増殖を抑制し得る新しい化合物が同定された。本化合物はカナマイシンなど第2選択薬と同程度の結核菌増殖抑制能力を持っていて、さらに多剤耐性結核菌にも有効に作用することが理論上考えられるため、今後非常に大きな期待が寄せられるところである。WHOは2035年までに結核罹患率・死亡率を大幅に下げることが目標として設定し、その方策として主方策4項目の中に、①新規ワクチン開発、②新規薬剤開発、③潜伏感染結核菌の生体外排除法の樹立の3点を掲げた。当研究班においては、これら3点全てにおいて著しい研究進展を遂げた。今後とも地球規模での厚生行政に貢献可能と期待される。

E. 結論

結核に対する予防法・治療法の開発に大きな成果が得られた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekizuka, T., M. Kai, K. Nakanaga, N. Nakata, Y. Kazumi, S. Maeda, M. Makino, Y. Hoshino, and M. Kuroda. 2014. Complete Genome Sequence and Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 in the *Mycobacterium abscessus* Group Reveal a Conserved Genomic Island MmGI-1 Related to Putative Lipid Metabolism. PLoS ONE, in press.
- 2) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y. Arakawa, and K. Shibayama. 2014. Roles of Ala-149 in the catalytic activity of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Biosci. Biotechnol. Biochem., in press.
- 3) Kim, H., K. Shibayama, E. Rimbara, and S. Mori. 2014. Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. PLoS ONE, 9(6): e100062.
- 4) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2014. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease-Deficient Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG That Produced a Heat Shock Protein 70-*M. tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., 21: 1-11.
- 5) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 2014. Polyclonal activation of naïve T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, Cys0 and major membrane protein-II. BMC Infect. Dis., 14: 179.
- 6) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2014. Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 80: 62-65.
- 7) Duthie, M. S., R. N. Coler, J. D. Laurance, L. H. Sampaio, R. M. Oliveira, A. L. Sousa, M. M. Stefani, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino, and S. G. Reed. 2014. Protection against *M. leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. Infect. Immun., 82: 3979-3985.
- 8) Nakanaga, K., T. Sekizuka, H. Fukano, Y. Sakakibara, F. Takeuchi, S. Wada, N. Ishii, M. Makino, M. Kuroda, and Y. Hoshino. 2014. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Clinical Isolates by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol., 52: 251-259.
- 9) Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama, and I. Kawamura. 2014. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 α from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. Pathog Dis., 70: 51-60.
- 10) Ohtsuka, K., H. Ohnishi, E. Nozaki, J. Pais Ramos, E. Tortoli, S. Yonetani, S. Matsushima, Y. Tateishi, S. Matsumoto, and T. Watanabe. 2014.

- Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium kyorinense*. Genome Announc., 2: e01062-01014.
- 11) Nishiuchi, Y., A. Tamaru, Y. Suzuki, S. Kitada, R. Maekura, Y. Tateishi, M. Niki, H. Ogura, and S. Matsumoto. 2014. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J. Water Health, 12: 211-219.
 - 12) Fujii, Y., S. Kaneko, S. M. Nzou, M. Mwau, S. M. Njenga, C. Tanigawa, J. Kimotho, A. W. Mwangi, I. Kiche, S. Matsumoto, M. Niki, M. Osada-Oka, Y. Ichinose, M. Inoue, M. Itoh, H. Tachibana, K. Ishii, T. Tsuboi, L. M. Yoshida, D. Mondal, R. Haque, S. Hamano, M. Changoma, T. Hoshi, K. Kamo, M. Karama, M. Miura, and K. Hirayama. 2014. Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. PLoS Negl Trop Dis., 8: e3040.
2. 学会発表
- 1) Fukui, M., M. Umemura, and G. Matsuzaki. Combined vaccination of subcutaneous BCG and intranasal HBHA with cholera toxin enhances early protective immunity against pulmonary *M. tuberculosis* infection. IMMUNOLOGY 2014™ AAI Annual Meeting, 2-6 May, 2014, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.
 - 2) Umemura, M., S. Touyma, M. Fukui, C. Fukui, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. Role of IL-17 in chronic pulmonary mycobacterial infection. IMMUNOLOGY 2014™ AAI Annual Meeting, 2-6 May, 2014, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.
 - 3) Niki, M. M. Niki, M. Osada-Oka, Y. Ozeki, and S. Matsumoto. BAM-PTH1073-Mycobacterial DNA-binding protein 1 induces phenotypic tolerance to isoniazid in mycobacteria. International Union of Microbiological Societies Congresses. 27 July-1 August, 2014 Montreal, Canada
 - 4) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, Y. Arakawa, and K. Shibayama. Molecular characterization of nicotinate phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and inhibition of its activity by pyrazinoic acid. FEBS-EMBO 2014. 30 August-4 September, 2014, Paris, France.
 - 5) 梅村正幸. 結核菌感染における肉芽腫形成および成熟に関するサイトカイン—特に IL-17 サイトカイン・ファミリーを中心として. 第 89 回日本結核病学会総会 2014 年 5 月 岐阜市 (教育講演)
 - 6) 河村伊久雄. 抗結核感染防御における ASC の重要性について. 第 84 回実験結核研究会 2014 年 5 月 岐阜市
 - 7) 梅村正幸, 福井雅之, 福井知穂, 中江進, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染肺における IL-33 の防御機構. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2014 年 6 月 札幌市
 - 8) 戸谷孝洋, 西内由紀子, 北中博美, 金子幸弘, 松本壮吉. 非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成時の特徴. 第 28 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 2014 年 7 月 9 日 東京
 - 9) 梅村正幸, 福井雅之, 福井知穂, 中江進, 松崎吾朗. IL-33 のマイコバクテリア感染防御免疫に対する増強効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会 2014 年 7 月 仙台市
 - 10) 福井雅之, 梅村正幸, 松崎吾朗. 新規抗肺結核ワクチン戦略による早期防御

- 免疫応答の増強. 第 25 回日本生体防御学会学術総会 2014 年 7 月 仙台市
- 11) 松崎吾朗, 沖田大和, 浜田聡, 梅村正幸. IL-22 が誘導するヒト Phospholipase A2 Group IIA (PLA2G2A) による *Listeria monocytogenes* 感染防御. 第 25 回日本生体防御学会学術総会 2014 年 7 月 仙台市
 - 12) 松本壮吉. 結核菌の増殖抑制や潜在結核菌の解析および、結核ワクチンの開発研究. 第 22 回呼吸器疾患・感染症研究会. 2014 年 8 月 東京
 - 13) 向井 徹, 松岡正典, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. ハンセン病ワクチンのための組換え BCG 株の構築. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 14) 田村敏生, 下袴田陽子, 前田百美, 牧野正彦. 追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリー T 細胞の分化調節機構の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 15) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 蛍光色素を利用した抗らい菌活性の新しい評価方法 - 薬剤の抗らい菌活性や宿主細胞の抗らい菌活性評価への応用 -. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 16) 前田百美, 田村敏生, 向井 徹, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームの miRNA 解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 17) 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のアミノ酸代謝解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 18) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の増殖能への関与が疑われる遺伝子の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
 - 19) 梅村正幸, 福井雅之, 當山清悟, 山崎雅俊, 福井知穂, 照屋 尚子, 中江進, 岩倉 洋一郎, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染における IL-17 サイトカイン・ファミリーの防御能. 第 67 回日本細菌学会九州支部総会 2014 年 9 月 鹿児島
 - 20) 福井雅之, 梅村正幸, 山崎 雅俊, 福井知穂, 照屋 尚子, 中江進, 松崎吾朗. マイコバクテリア感染早期におけるインターロイキン (IL)-33 の防御効果. 第 67 回日本細菌学会九州支部総会 2014 年 9 月 鹿児島市
 - 21) 梅村正幸. 結核肺感染における interleukine-17 の関与とその応用. 第 10 回霊長類医科学フォーラム 2014 年 11 月 つくば市 (招待講演)
 - 22) 松本壮吉, 尾関百合子. 成人の肺結核予防を目指した、新しい結核ワクチンの開発研究. 中部乳酸菌研究会発表会. 2014 年 11 月 長野市
 - 23) 前山順一, 山崎利雄, 山本十糸子, 林大介, 尾関百合子, 松本壮吉, 伊保澄子, 山本三郎. TLR9 リガンドである G9.1 をアジュバントとして用いた結核ブースターワクチンの開発. 日本ワクチン学会学術集会. 2014 年 12 月 福岡市
 - 24) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Umemura. Effect of Peptide-25 of Ag85B on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 京都市.
 - 25) Shimohakamada, Y., and T. Tamura. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 京都市
 - 26) Umemura, M., M. Fukui, M. Yamasaki, C. Fukui, T. Tamura, S. Nakae, and G. Matsuzaki. Involvement of IL-33 in the protective immunity against lung mycobacterial infection. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 京都市
 - 27) 藤川健弥, 北田清悟, 松本壮吉, 前倉

亮治. LTBI 症例における血清抗体を用いた前発病状態の検出. 第 90 回日本結核病学会. 2015 年 3 月 長崎市

1. 特許取得 申請中
(特願 2014-241429)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
分担研究報告書

新規リコンビナント BCG ワクチンの作出と評価

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官）

研究要旨.

結核は、致死率が高く制御が極めて難しい慢性感染症である。弱毒化牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis* BCG (BCG)) がワクチンとして長い間世界各地で使われてきているが、成人・高齢者の結核発症を予防することはできず、新しい信頼できるワクチンの開発が切望されている。本研究では、遺伝子組換え技法を用いて BCG に改良を加え、新しく実用可能な新規リコンビナント BCG を開発することを目的としている。この目的のため、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に PEST-HSP70-MMP-II-PEST 連結遺伝子を導入し、新しく BCG-PEST を作製した。BCG-PEST は、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞、さらには樹状細胞及びマクロファージを強く活性化すると同時に、マウス生体内において結核菌由来抗原性分子に強く反応し、IFN- γ を産生するメモリー T 細胞を産生した。また、BCG-PEST をワクチンとして用いると、マウス肺内において結核菌標準株である H37Rv の増殖を 99% 抑制し、同時に強毒株及び臨床分離北京結核菌株の増殖も抑制した。こうしたワクチン効果は、ワクチン接種後 6 ヶ月以上持続した。したがって、BCG-PEST は結核ワクチンとして求められる全ての要素を有しており、現行の BCG に代わる新しいワクチンとなり得るものと想定された。

A. 研究目的

結核菌に対する生体防御反応は細胞性免疫応答を中心に営まれており、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を中心とした獲得免疫が極めて重要な位置を占める。したがって、ワクチンは未感作 T 細胞を充分活性化し、メモリー T 細胞を産生する強い免疫原性を有すると同時に、結核菌と抗原性を共有し結核菌感染細胞に迅速に反応するメモリー T 細胞を産生する能力を有している必要がある。BCG が何故ワクチンとして充分その役割を果たすことができないのか、その理由は十分に明らかになってはいないが、一つの大きな要因として、BCG はマクロファージ等の抗原提示細胞に感染するとファゴゾームを形成し、ファゴ-ライソゾームの形成を阻止するために、BCG 由来の抗

原性分子のエピトープが抗原提示細胞表面に充分発現しないことに起因すると考えられている。したがって、BCG に改良を加えるにあたっては、BCG のこの固有の欠点を凌駕することが重要であり、これまでにその方策として、BCG の有するウレアーゼ活性を除去すること、及び抗原性分子をファゴゾーム等で分泌することが極めて有用であることを見い出してきた。そこで、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入し BCG-DHTM を作製し、ワクチンとしての有効性を評価してきた。ここでは、MMP-II は結核菌の主要抗原として、HSP70 を MMP-II の T 細胞活性化能を増強させる補助因子として用いた。BCG-DHTM は、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し、

マウス生体内で結核菌の増殖を抑制した。しかし残念ながら、その抑制程度は充分なものではなかった、そこで、BCG-DHTM の T 細胞活性化能を増強し、ワクチン効果を増強させることを目的とした。この目的のために、抗原提示細胞内のプロテアゾームで蛋白分解を誘導する能力を持つ、4 つのペプチドからなるシグナルペプチド：PEST 配列に着目した。すなわち、HSP70-MMP-II 連結遺伝子の両端に PEST 配列を付与し（PEST-HSP70-MMP-II-PEST 連結遺伝子の作製）、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に導入して BCG-PEST を作製し、ワクチンとしての有効性の評価を行った。

B. 研究方法

UreC 遺伝子欠損リコンビナント BCG の DNA に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子と BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、さらに HSP70-MMP-II 連結遺伝子の両端（N 末端及び C 末端）に PEST 配列を連結させ遺伝子導入しリコンビナント BCG（BCG-PEST）を作製した。BCG-PEST を評価するにあたり、コントロールリコンビナント BCG として、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入した BCG-DHTM 及びベクターコントロール BCG（BCG-261H）を用いた。正常健康人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント（r）GM-CSF 50ng/ml および rIL-4（10ng/ml）を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、BCG-PEST あるいはコントロールリコンビナント BCG を感染させ成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- γ および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用いた。IFN-

γ および IL-2 は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を MHC 抗原に対する抗体および CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-PEST 感染樹状細胞による T 細胞活性化機構を探索する目的で、樹状細胞を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- γ の産生量により評価した。さらに、BCG-PEST のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスにリコンビナント BCG を皮下接種し、6 週あるいは 12 週間後に脾臓を摘出し、脾中 T 細胞を *in vitro* で MMP-II、HSP70 及び結核菌由来細胞質および細胞膜蛋白で刺激した際に、T 細胞が産生する IFN- γ を測定し評価した。また、BCG-PEST のワクチン効果を評価するため、BCG-PEST 及びコントロールリコンビナント BCG を C57BL/6 マウスに皮下接種し、その 4~6 週間後に結核菌 H37Rv あるいは強毒株結核菌（Erdman 株）、北京株（臨床分離株）を空気感染させ、4 週間後に肺内に存在する結核菌数をコロニーアッセイで算出した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解（インフォームドコンセント）を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

BCG-PEST は 菌 体 外 へ

PEST-HSP70-MMP-II-PEST 融合蛋白を分泌し、樹状細胞に感染させると IL-12p70・TNF α ・IL-1 β などのサイトカインを BCG-DHTM 及び BCG-261H に比し効率的に産生誘導した。また、樹状細胞の細胞表面の抗原を解析すると、MHC クラス I 及び II・CD86 さらに CD83 抗原を強く発現させ、さらに M-CSF を用いて分化誘導したマクロファージからも大量の IL-12p40・IL-1 β ・TNF α 及び GM-CSF を産生させた。BCG-PEST を樹状細胞に感染させた後、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると大量の IFN- γ を産生し、T 細胞からの IFN- γ の産生は、BCG-PEST 感染樹状細胞を抗 MHC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると抑制され、さらにクロロキニンで樹状細胞を処理しても抑制された。また、未熟樹状細胞を予め proteosomal protein blocker である Lactocystin で処理した後、BCG-PEST を感染させ、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を刺激すると BCG-PEST の T 細胞活性化能は有意に抑制された。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-PEST 及びコントロール BCG を皮下接種し、6 週あるいは 12 週後に脾 T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II、HSP70 あるいは結核菌 H37Rv 由来細胞質蛋白および細胞膜蛋白で再刺激すると、BCG-PEST 感染マウスから得た T 細胞は、コントロール BCG に比し、より大量の IFN- γ を産生した。さらに、BCG-PEST のワクチン効果を C57BL/6 マウスを用いて評価すると、BCG-PEST は BCG-DHTM あるいは BCG-261H に比し、有意に強くマウス肺内での H37Rv、Erdman 株、北京株（臨床分離株）の増殖を抑制した。BCG-PEST をワクチンとして用いると、陽性コントロール（ワクチン非接種マウス）に比し、結核菌の増殖を 99%抑制し、1%にまで減弱させた。さらに、このワクチン効果は 6 ヶ月間持続した。

D. 考察

BCG-DHTM の T 細胞活性化能及び抗結核ワクチン効果を増強させるために、4 つのアミノ酸、P（プロリン）、E（グルタミン酸）、S（セリン）及び T（スレオニン）からなる

シグナルペプチドである PEST 配列を利用し、BCG-PEST を作製した。BCG-DHTM においては、分泌される HSP70-MMP-II 融合蛋白が主にライソゾームで分解（プロセッシング）されるが、ライソゾームの中で分解されず細胞質へ放出された融合蛋白をさらに分解するため、プロテアゾーム内で蛋白分解を誘導する PEST 配列を付与した。すなわち、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に PEST-HSP70-MMP-II-PEST 連結遺伝子を導入して BCG-PEST を作製した。その結果 BCG-PEST は、

- 1) BCG-PEST は、BCG-DHTM に比しより強く樹状細胞・マクロファージといった抗原提示細胞のみならず、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化した。
- 2) BCG-PEST は、マウス生体内で BCG-DHTM あるいはベクターコントロール BCG（BCG-261H）に比し、より効率的にメモリー T 細胞を産生した。
- 3) BCG-PEST は、標準株結核菌である H37Rv の増殖を 99%抑制し、肺内結核菌を 1%にまで低下させた。
- 4) BCG-PEST のワクチン効果は、BCG-DHTM のそれよりも有効であった。
- 5) BCG-PEST は、H37Rv 株のみならず強毒株である Erdman 株及び臨床分離株である北京株の増殖を抑制した。
- 6) BCG-PEST のワクチン効果は、接種後 6 ヶ月以上持続した。

結核菌に対する生体防御反応は獲得免疫を中心に営まれているが、この中で CD4 陽性 T 細胞は結核菌感染初期に、CD8 陽性 T 細胞は感染後期に作用すると考えられている。BCG-PEST と BCG-DHTM の T 細胞活性化能を比較すると、CD4 陽性 T 細胞活性化能は両者に大きな差があり、BCG-PEST は樹状細胞を介した未感作 CD4 陽性 T 細胞及びマクロファージを介したメモリー T 細胞を BCG-DHTM に比し非常に強く活性化した。一方、未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化においては、BCG-PEST、BCG-DHTM とともに比較的大量の BCG を用いた場合のみ観察された。したがって、BCG-PEST の強いワクチン効果は、

CD4 陽性 T 細胞の活性化に起因するものと考えられた。

BCG-DHTM のワクチン効果が部分的であった原因の一つとして、BCG-DHTM の作製において結核菌の病原性因子が用いられていないことが考えられた。しかし、BCG-PEST においてもそれら病原性因子は用いられておらず、宿主抗原提示細胞内で分泌された蛋白の分解機会を増大させることのみで、充分有効に作用するワクチンを作製し得ることが判明した。結核菌の病原性因子を BCG に付与すると、BCG の形質転換を誘導する危険性があり、安全面において大きな問題を惹起する可能性がある。しかし、BCG-PEST においては安全性が確認されている BCG のコンポーネントのみが使用されており、この点極めて安全と考えられる。したがって、有効性及び安全性の両面においてワクチンとして求められる全ての要素を保有する新しいリコンビナント BCG が作製されたと考えられる。

E. 結論

PEST 配列を利用、安全かつ有効な新しいリコンビナント BCG が作製された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekizuka, T., M. Kai, K. Nakanaga, N. Nakata, Y. Kazumi, S. Maeda, M. Makino, Y. Hoshino, and M. Kuroda. 2014. Complete Genome Sequence and Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 in the *Mycobacterium abscessus* Group Reveal a Conserved Genomic Island MmGI-1 Related to Putative Lipid Metabolism. PLoS ONE, in press.
- 2) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2014. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease-Deficient Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG That Produced a Heat Shock Protein 70-*M.*

tuberculosis-Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., 21: 1-11.

- 3) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 2014. Polyclonal activation of naïve T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, Cys0 and major membrane protein-II. BMC Infect. Dis., 14: 179.
 - 4) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2014. Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 80: 62-65.
 - 5) Duthie, M. S., R. N. Coler, J. D. Laurance, L. H. Sampaio, R. M. Oliveira, A. L. Sousa, M. M. Stefani, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino, and S. G. Reed. 2014. Protection against *M. leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. Infect. Immun., 82: 3979-3985.
 - 6) Nakanaga, K., T. Sekizuka, H. Fukano, Y. Sakakibara, F. Takeuchi, S. Wada, N. Ishii, M. Makino, M. Kuroda, and Y. Hoshino. 2014. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Clinical Isolates by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol., 52: 251-259.
- ### 2. 学会発表
- 1) 向井 徹, 松岡正典, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. ハンセン病ワクチンのための組換えBCG株の構築. 第87回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014年9月 所沢市
 - 2) 田村敏生, 下袴田陽子, 前田百美, 牧野正彦. 追加免疫法の開発に向けた樹

- 状細胞による細胞障害性メモリーT 細胞の分化調節機構の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
- 3) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 蛍光色素を利用した抗らい菌活性の新しい評価方法 - 薬剤の抗らい菌活性や宿主細胞の抗らい菌活性評価への応用 -. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
- 4) 前田百美, 田村敏生, 向井 徹, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームの miRNA 解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
- 5) 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のアミノ酸代謝解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
- 6) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の増殖能への関与が疑われる遺伝子の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 申請中
(特願 2014-241429)
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (新興・再興感染症に対する
革新的医薬品等開発推進研究事業))

結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索と
その構造機能解析

分担研究報告書

研究分担者

柴山 恵吾

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））
分担研究報告書

結核等抗酸菌の新規薬剤開発のための標的分子の探索とその構造機能解析

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
協力研究者 森 茂太郎 （国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
協力研究者 金 玄 （国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）

研究要旨.

既存の薬剤に耐性を示す多剤耐性結核症や有効な薬剤が少ない非結核性抗酸菌症の治療に有用な新規薬剤の開発が臨床現場では強く求められている。そこで本研究課題では、結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素を標的とした新規薬剤の開発を試みるとともに、結核菌に特異的な細胞壁構造や生体内での代謝機能に関わる遺伝子・タンパク質を新規薬剤の標的分子として捉え、その機能と構造の解析を行うことを目的としている。本年度は、昨年度までに行ったドッキングシミュレーションの結果に基づいて結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤候補として選んだ73種類の化合物のうち、9種類の化合物が実際に本酵素に対して阻害活性を示すことを明らかにした。これまでに得られている6種類の新規阻害剤と合わせて、本研究課題で見出した新規阻害剤は合計15種類となり、ヒット率は約14%であった。さらに、見出した結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の新規阻害剤の構造情報に基づいてドラッグデザインを行い、結核菌に対して抗菌活性を示す新規化合物を同定した。結核菌に対する新規化合物の最小発育阻止濃度（MIC）は32 μ g/mLであった。今後は、細胞毒性や薬剤耐性結核菌に対するMIC値を測定することによって、新規薬剤の開発につながることを期待される。また、昨年度までに大腸菌内で可溶性タンパク質として発現させた結核菌由来Rv1509とRv1514cのうち、Rv1509について精製と酵素活性の測定を行った。その結果、Rv1509は1次構造上のモチーフ解析の結果から予想させた通り、メチルトランスフェラーゼ活性を有することが示唆された。今後はさらに詳細な機能と構造の解析を行うことによって、新規薬剤のドラッグデザインを目標とした標的分子の機能構造相関解析を進めることが可能であると考えられた。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌や *Mycobacterium avium* 等の非結核性抗酸菌が引き起こす難治性の感染症が大きな問題となっているにもかかわらず、有効な治療法がほとんど存在しないことから、新たな治療法、特に新規薬剤の開発が臨床現場では強く求められている。現在、いくつかの新規薬剤の開発が進められているものの、それらの多くは既存の薬

剤の構造類縁体であることから、薬剤耐性菌の早期出現や交差耐性等が懸念されている。そのため、新しい作用機序をもつ新規薬剤の開発が重要な課題となっている。特に、結核菌や非結核性抗酸菌にのみ特異的に抗菌活性を示す新規薬剤が求められている。そこで本研究課題では、次に示す2つの研究を行い、新規薬剤の開発に結びつけることを目的としている。1つ目の研究で