

子発現の抑制を担う重要分子であることを明らかにしてきたが、MDP1は抗酸菌に広く存在する分子であることから、非結核性抗酸菌においても、なんらかの役割を担うことが推測される。

このような背景と考察から、本研究班では、非結核性抗酸菌症の新規診断法の開発と、そのベースとなる、非結核性抗酸菌の生態や病原機構について解析する。診断法開発については、プロテオミクス解析を立ち上げ、非結核性抗酸菌に特徴的な新規診断抗原を同定し新しい診断法の開発を目指す。病原メカニズム解析では、持続感染に関わると推定されるMDP1の機能に加え、ヒト環境における病原体の生存形態としてバイオフィーム形成について解析を行う。

B. 研究方法

試供菌と培養

Mycobacterium smegmatis, *Mycobacterium smegmatis* MDP1-KO (*Hyg^r*), およびMDP1 補填株 *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* 104 を7H9-ADC培地にて培養し、吸光度600nmの測定で、0.5前後を増殖菌、1.2以上を静止期菌として解析に試供した。

蛋白質の抽出とプロテオミクス解析

7H9-ADC培地にて増殖させた菌を遠心分離にて集菌し、ビーズ式ホモジナイザーで、粉碎した。粉碎条件は、5,000rpm、30秒、3回とした。上清中の蛋白質量をBCA法にて測定した。等電点電気泳動は、GE社のEttan IPGphor 3 IEF Systemを使い、pI3-10のストリップにて実施した。ゲルは、質量分析用銀染色法にて染色し、蛋白質スポットの定量は、Image Jソフトを用いた。次に、二次元電気泳動スポットを無塵性ナイフで抽出し、トリプシン消化後に、AB SCIEX社製 Triple TOF 5600にて分析を行った。データベースとの照合は、マスコットにて実施した。

非結核性抗酸菌症患者血清の抗体応答検出

M. avium subsp. *Hominissuis* 蛋白質を抽出後、SDS-PAGEにて展開し、PVDF膜に転写した。膜をブロッキング後、1%スキムミルクにて希釈した非結核性抗酸菌症患者3名分の血清と反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイミュノグロブリン抗体で反応させ、再度洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagentsを加え、発光を

WSE-6100 LuminoGraph ルミノグラフにて検出した。

倫理面への配慮

国立病院機構刀根山病院で人検体を用いた研究計画書の倫理申請を行い、検者に対してインフォームドコンセントを得て検体を取得し研究を行った。

C. 研究結果

非結核性抗酸菌のプロテオミクス解析の立ち上げとMDP1による遺伝子発現調節の解析

二次元電気泳動と質量分析による、非結核性抗酸菌関連プロテオミクス解析系の立ち上げを行った。非結核性抗酸菌の弱毒非結核性抗酸菌である *M. smegmatis*、および結核菌で増殖制御や持続性感染に関わることが判明しているMDP1の欠失株、およびその入れ戻し株を用いて、プロテオミクス解析系の構築にあわせてMDP1の支配下にある遺伝子発現を観察した。

7H9-ADC培地にて培養した3菌株を静止期まで培養し、ビーズ式ホモジナイザーで破碎し蛋白質を抽出した。3菌株の抽出蛋白質量の測定から、まず、MDP1欠失株で、抽出蛋白質量が多いことが判明した。これは、結核菌と同様、MDP1が *M. smegmatis* においても、遺伝子の発現を抑制するため、産生蛋白質量が欠失株で増大する可能性が示唆された。

次に pI3-10 のストリップを用いて、*M. smegmatis* 3株由来蛋白質を、電荷で分離し、更にSDS-PAGEを行い分子量で分離する二次元電気泳動を行った。同実験を3度独立して行い、それぞれの蛋白質スポットの濃淡を、Image Jで解析した結果、欠失株と野生株・補填株で異なる量を示す73蛋白質スポットを検出した。その中で、3倍以上、量比の異なる24の蛋白質スポットについて、ゲル抽出—トリプシン消化—質量分析装置によるペプチドの質量分析—マスコットによるデータベースマッチングを行った。

解析の結果から、24スポット中、23スポットの蛋白質を同定することができた。そのうち、6スポットは、それぞれ同一の3蛋白質で、翻訳後修飾の結果、異なるスポットに泳動されることが分かった。未発表データのため、個々の遺伝子名の公表は控えるが、DNAや蛋白質合成関連遺伝子、

酸化還元酵素類、トランスポーター、脂質合成酵素、シャペロンの発現量が、欠失株で3倍以上上昇していることが判明した。

M. avium の二次元電気泳動プロファイルと患者血清反応

M. smegmatis を用いて確立した系を、用いて *M. avium* subsp. *Hominissuis* の蛋白質発現を解析した。*M. avium* 104 を 7H9-ADC 培地で培養し、増殖期と静止期の菌を得た。同様に菌体をビーズ式ホモジナイザーで破碎して蛋白質を抽出後、SDS-PAGE とトリシン-グリシンゲルにて電気泳動を行い、一次元電気泳動で蛋白質の質を確認、また増殖期と静止期において、一部の蛋白質バンドの差異を確認した。

次に pI3-10 のストリップを用いて増殖期と静止期の蛋白質スポットを二次元電気泳動で解析した。その結果、増殖期と静止期で顕著に発現量が異なる 12 の蛋白質スポットを検出した。現在、この 12 スポットの同定を行っている。

上記のプロテオミクスによる抗原の同定系の確立をうけ、実際の非結核性抗酸菌症患者において、*M. avium* subsp. *Hominissuis* 由来蛋白質に反応する抗体が産生されているかをウエスタンブロット法で確認した。国立病院機構刀根山病院で入院・通院する患者由来血清とツベルクリン反応陰性者由来血清を対照として試験を行った。その結果、ツベルクリン応答陰性者では反応しないが、患者血清を 3,000 倍以上希釈しても反応する複数の蛋白質が存在することを見いだした。現在、これらのスポットについてプロテオミクス解析による同定を進めており、来年度には、新規の診断候補抗原として同定したい。

進行中の研究

上記の結果に加え、新しい非侵襲的な診断法の開発を目指し、尿中の疾患特異的マーカーの検出を目指している。本年度は、国立病院機構刀根山病院(前倉 亮治 先生、北田 清吾 先生)で、倫理申請書を受理いただき、尿サンプルの収集を開始した。

播種性の非結核性抗酸菌症患者では、IFN-gamma シグナリングを阻害する抗体が産生されていることが知られており、患者では細胞レベルで STAT1 のリン酸化が生じない。従って血中

の STAT1 リン酸化を阻害する物質(抗体)の有無で、播種性非結核性抗酸菌症を診断できる可能性がある。レポーター遺伝子を用いた新規診断法の開発が、新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸器・感染症内科学 坂上拓郎 博士等により進められている。

M. avium subsp. *Hominissuis* のバイオフィーム形成について解析し、低栄養よりも富栄養下、低酸素下においてバイオフィーム形成を行うことを明らかにしている。

D. 考察

非結核性抗酸菌症の新規診断法の確立を目指し、初年度である本年は、非結核性抗酸菌蛋白質のプロテオミクス解析系の立ち上げを行った。また、立ち上げに平行して抗酸菌の持続性感染に関与すると推定される MDP1 の支配遺伝子を解析した。さらに実際の非結核性抗酸菌症患者由来の血清を用いて、患者に特異的な抗体応答があるかについてパイロット試験を行った。

野生型 *M. smegmatis* と MDP1 欠失菌で産生量の異なる蛋白質を、二次元電気泳動—イメージングによる定量、AB SCIEX 社製 Triple TOF5600 質量分析装置にて解析し、銀染色で検出できるレベルの蛋白質を 24 スポット中、23 スポット同定することができた。本結果は、新規診断抗原の同定にたえうる解析系が立ち上がったことを示す。

また、非結核性抗酸菌においても、結核菌群と同様、MDP1 が遺伝子発現の制御に強く関与していることも判明した。MDP1 の支配下には、DNA 合成—蛋白質合成系の他に、レドックス遺伝子の発現を抑制していることが判明した。ヒト環境中での生息や、生体内での持続感染に、結核菌同様、MDP1 が関わる可能性がある。

またプロテオミクスを利用し、ゲノム情報が判明している、*M. avium* subsp. *Hominissuis* 104 の蛋白質を解析した。増殖相により発現量が顕著に異なる蛋白質スポットを 12 特定し、現在、同定を行っている。*M. avium* において増殖相に依存した蛋白質発現の解析は少なく、このような蛋白質が、非結核性抗酸菌の生存や病原性にどのように関与するのか、今後明らかにしていきたい。

我々はさらに、予備試験において、非結核性抗酸菌症患者の抗血清が反応する蛋白質の存在を

確認した。現在、患者検体数を増やし、患者血清が広く特異的に反応するスポットの特定を進めている。研究を進め、来年度には、主要蛋白質抗原の同定、最終年度には診断キットの原型を作成したい。

E. 結論

① 新規非結核性抗酸菌感染症の診断法確立を目指し、非結核性抗酸菌のプロテオミクス解析系を確立した。

② MDP1 は、非結核性抗酸菌においても、静止期において、多数の蛋白質発現を制御しており、特に持続性感染との関連性が示唆された。

③ 予備試験において、非結核性抗酸菌感染症患者中の抗血清が反応する蛋白質抗原の存在を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Nozaki, E., Pais Ramos, J., Tortoli, E., Yonetani, S., Matsushima, S., Tateishi, Y., Matsumoto, S. and Watanabe, T. 2014. Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium kyorinense*. Genome Announc. 2: e01062-01014.
- 2) Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H. and Matsumoto, S. 2014. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health. 12: 211-219.
- 3) Nagi, S., Chadeka, E. A., Sunahara, T., Mutungi, F., Justin, Y. K., Kaneko, S., Ichinose, Y., Matsumoto, S., Njenga, S. M., Hashizume, M., Shimada, M. and Hamano, S. 2014. Risk Factors and Spatial Distribution of *Schistosoma mansoni* Infection among Primary School Children in Mbita District, Western Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 8: e2991.
- 4) Morimoto, K., Ozawa, T., Awazu, K., Ito, N., Honda, N., Matsumoto, S. and Tsuruta, D. 2014. Photodynamic Therapy Using Systemic Administration of 5-Aminolevulinic Acid and a 410-nm Wavelength Light-Emitting Diode for

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Infected Ulcers in Mice. PLoS One. 9: e105173.

- 5) Fujii, Y., Kaneko, S., Nzou, S. M., Mwau, M., Njenga, S. M., Tanigawa, C., Kimotho, J., Mwangi, A. W., Kiche, I., Matsumoto, S., Niki, M., Osada-Oka, M., Ichinose, Y., Inoue, M., Itoh, M., Tachibana, H., Ishii, K., Tsuboi, T., Yoshida, L. M., Mondal, D., Haque, R., Hamano, S., Changoma, M., Hoshi, T., Kamo, K., Karama, M., Miura, M. and Hirayama, K. 2014. Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. PLoS Negl Trop Dis. 8: e3040
- 6) 松本 壮吉、尾関 百合子。結核ワクチン開発の現状と新しい結核ワクチン開発に向けて。化学療法の領域。30 巻、p127-134, 2014.
- 7) 西内 由紀子、松本 壮吉。抗酸菌の細菌学的特徴と病原性。感染症内科。2 巻、p8-14, 2014
- 8) 松本 壮吉。結核とその制圧を目指した研究。新潟県医師会報。第 766 号。P2-7, 2014

2. 書籍

- 1) 西山 晃史、松本 壮吉。病原微生物学、荒川 宣親、神谷 茂、柳 雄介 監修、抗酸菌と放線菌。東京化学同人、東京。120-129、2014。

3. 学会発表

- 1) 仁木 満美子、仁木 誠、松本 壮吉。潜在性結核および内因性再燃の検出を目的とした血清診断法の開発。第 87 回日本細菌学会総会。2014 年 3 月 26 日-28 日。東京都
- 2) 尾関 百合子、武田 知芳里、岡部 真裕子、井上 学、岡 真優子、平山 幸雄、一瀬 休生、小林 和夫、松本 壮吉。ケニア共和国ワクレ地区小学生を対象とした潜在性結核感染と寄生虫感染の関連。第 87 回日本細菌学会総会。2014 年 3 月 26 日-28 日。東京都
- 3) 戸谷 孝洋、西内 由紀子、松本 壮吉。非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成解析。第 87 回日本細菌学会総会。2014 年 3 月 26 日

- 28日、東京都
- 4) 今川 裕香子、岡 真優子、尾関 百合子、松本 壮吉. マクロファージの糖代謝酵素とグルコース濃度による結核菌の増殖抑制. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月26日-28日. 東京都
- 5) 前山 順一、山崎 利雄、山本 十糸子、林 大介、松本 壮吉、網 康至、須崎 百合子、伊保 澄子、山本 三郎. 結核菌組換えタンパク質およびTLR9リガントを用いた結核ブースターワクチンの結核菌噴霧感染による評価. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月26日-28日. 東京都
- 6) Makoto Niki, Mamiko Niki, Mayuko Osada-Oka, Yuriko Ozeki, Sohkiichi Matsumoto. Mycobacterial DNA-binding protein 1 induces phenotypic tolerance to isoniazid in mycobacteria. International Union of Microbiological Societies Congresses. July 27-August 1, 2014 Montreal Canada
- 7) 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23日. 東京都
- 8) 尾関 百合子、松本 壮吉. 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24日. 長野市
- 9) 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6-7日. 福岡市
- G. 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

非結核性抗酸菌脂質に対する免疫応答に基づく診断法ならびに治療・予防法の確立

担当責任者 杉田昌彦 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨：

抗酸菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は、宿主環境への暴露ならびに宿主免疫系との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わると考えられる。とりわけ、非結核性抗酸菌の多くは環境常在菌であり、外界環境に置かれた場合と生体内において感染が成立した場合には細胞壁糖脂質組成の大きな変化が生じるものと考えられる。実際、研究分担者のこれまでの研究から、生体内増殖抗酸菌は外界環境にはない高濃度のグルコースに暴露される結果、グルコースモノミコール酸（GMM）を新生する。一方宿主は、この GMM を標的としたグループ 1CD1 拘束性 T 細胞応答を誘起する。したがって、この GMM 特異的 T 細胞応答は、非結核性抗酸菌の宿主内増殖すなわち感染成立の優れた指標となることが予想できる。そこで本研究において、適切な動物モデル（モルモットやアカゲザル）を確立し、この作業仮説の実証を通して細胞性免疫に着眼した非結核性抗酸菌感染症の新たな診断法を提案する。さらに GMM のサブユニットワクチンとしての効果を検証し、非結核性抗酸菌を対象とした脂質ワクチンの開発を視野に研究を展開する。初年度 *Mycobacterium avium complex* (MAC)を用い、環境常在菌を模した人工培養系を確立した。さらにそれをモルモットに接種することにより、GMM 特異的細胞性免疫（遅延型アレルギー応答）が誘起されることを実証した。今後、この応答をより鋭敏かつ簡便に検出する系の確立を目指す。

A. 研究目的

抗酸菌細胞壁には多量の脂質が存在する。とりわけ抗酸菌特有の長鎖脂肪酸であるミコール酸の存在は、高度の疎水性を有する細胞壁の構築に寄与し、抗酸性を規定する重要な要因であると考えられている。また細胞壁最表層に存在するミコール酸含有脂質・糖脂質の多くはさまざまな生物活性を發揮し、病態形成に深く関与する。たとえば古くよりコードファクターとして知られるトレハロースジミコール酸（TDM）は宿主自然免疫受容体である Mincle (macrophage inducible C-type lectin) のリガンドとしてつよいアジュバント活性を有する（杉田ら *J Biol Chem* 289:15405, 2014）。これに対して病原性抗酸菌は、生体内に高濃

度で存在するグルコースを競合的基質としたミコール酸転移反応によりグルコースモノミコール酸（GMM）を新生するとともに、TDM の産生を抑制し、宿主自然免疫から回避する（杉田ら *J Biol Chem* 283:28835, 2008）。一方、宿主獲得免疫はこの GMM を標的とした T 細胞応答を惹起することが明らかとなった（杉田ら *J Biol Chem* 286:16800, 2011）。樹状細胞や活性化マクロファージなど抗酸菌の主要な感染宿主細胞に発現したグループ 1 CD1 分子は GMM を結合し、これを特異的に認識する T 細胞抗原受容体を発現した T 細胞を活性化し、抗酸菌制御に働く。したがって、GMM 脂質を標的としたこの新しい T 細胞応答は、抗酸菌感染症の診断法や治療・予防法においてこれまででない

切り口を与えてくれるものと考えられる。

ヒト非結核性抗酸菌感染症の主要な原因菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) は本来環境常在菌であり、グルコースがほとんど存在しない環境で生育する。しかしミコール酸転移酵素のグルコース基質に対する親和性は極めて高い。したがって、感染が成立し宿主由来のグルコースに暴露されると、すみやかに GMM を産生し、これに呼応した GMM 特異的 T 細胞応答が誘導されると考えられる。すなわち GMM に対する T 細胞応答の存在は、環境常在菌である MAC への一時的暴露ではなく、感染成立の鋭敏な生物学的指標となることが予想される。

以上の学術的背景ならびに考察をもとに、本研究においてヒト MAC 感染症の新たな診断法の開発を目的とした基礎研究を展開する。

B. 研究方法

抗酸菌株およびその培養 American Type Culture Collection より得た *M. avium* (serovar 4) (以下 MAC と記載)あるいは BCG ワクチン株 (Tokyo 172 株を用い、7H9 メディウムをベースとした液体培地で培養した。

脂質精製 脂質の精製は既報 (杉田ら *J Biol Chem* 283:28835, 2008) の記載に従った。菌体より抽出した総脂質をクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)に溶解したのち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィー (TLC)により展開し、GMM を含んだ分画を単離精製した。精製した GMM をマススペクトロメトリに供し、分子確認を行った。また得られた GMM を、ステアリン酸付加

オクタアルギニンを含むリポソームに封入した。

モルモット 週齢のメス Hartley モルモットは、日本 SLC より購入し、SPF 環境下で飼育した。MAC 生菌 (1×10^8 CFU) あるいはこれに相当する加熱処理死菌を接種し、6 週後に GMM (5 μ g) 含有リポソームあるいはコントロールリポソームを皮内接種した。以後経時的に皮膚硬結径を測定した。さらに所属リンパ節を回収し、免疫解析に用いた。

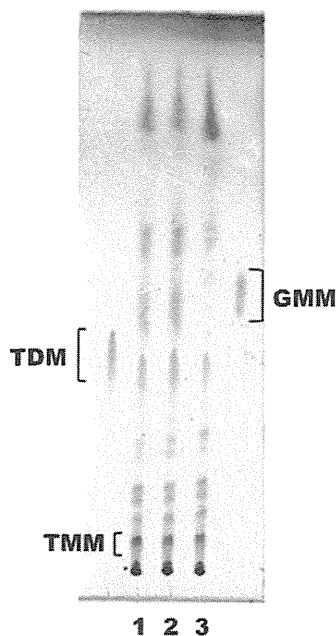
サイトカイン mRNA 発現解析 リンパ節より細胞を単離し、GMM リポソーム (1 mg/ml) 存在下で培養した。18 時間後に細胞を回収し、キアゲンキットを用いてトータル RNA を単離した。さらに oligo(dT)を用いた常法に従い、逆転写反応を行い、鋳型となる一本鎖 DNA を作成した。RT-PCR に用いたプライマーは下記の通りである。IFN-gamma : 5'-CTA GCT ACT ACT GCC AGT CAA GAT-3' (sense)、5'-GCT CTG AAA CAG CAT CTG AGT CCT-3' (anti-sense) ; TNF-alpha ; 5'-CCA TGA GCA CAG AAA GCA TGA TCC G-3' (sense) 、5'-CTC ACA GGG CAA TGA CCC CAA AGT A-3' (anti-sense) ; IL-5 : 5'-CCA TGA GGG TGC TTC TGC AGT TGG G-3' (sense) 、5'-CTC AGC CTT CAA TTG TCC ATT CCG T-3' (anti-sense) ; IL-10 : 5'-GGC ACG AAC ACC CAG TCT GA-3' (sense)、5'-TCA CCT GCT CCA CTG CCT TG-3' (anti-sense) 。

(倫理面への配慮)

本研究は、生命倫理や動物愛護、安全対策の観点から、所属機関で定められた規定に則り、当該委員会での承認を得て遂行した。

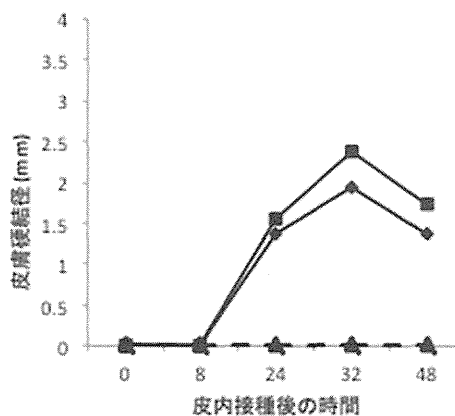
C. 研究結果

GMMを産生しないMAC菌の適切な培養条件の決定 7H9に市販のADCエンリッチメントを添加した標準人工培地においては0.2%のグルコースが存在する。これを用いてMACを培養した場合、顕著なGMM産生が検出された(図レーン1)。そこでまずすべての成分を自前で作製したADCを添加した培地を用い、菌が同等に生育することを確認した(図レーン2)。ついで炭素源であるグルコースをグリセロールに代え培養を試みた。その結果、MAC菌は順調に生育し、GMMを産生しないことが確認された(図レーン3)。



MAC生菌感染あるいは死菌感作モルモットにおけるGMM皮内テスト 2匹のモルモット(図、四角およびダイヤモンド)にはMAC生菌を、また1匹のモルモット(図、三角)には比較対象として加熱処理MAC死菌を接種した。6週後にGMMリポソームおよびコントロールリポソームを接種し、経時的に硬結径をモニターしたとこ

ろ、MAC生菌接種個体においてはGMMに対する特異的組織応答が認められたのに対し、MAC死菌接種個体においてはGMM応答が検出されなかった。このことから、GMMを産生していなかったMAC生菌が、生体内においてGMMを新生し、GMM特異的T細胞応答が誘起されたと結論づけた。



リンパ節におけるGMM特異的応答の検出 MAC生菌接種個体よりリンパ節細胞を単離し、GMM刺激を行ったのちトータルRNAを抽出した。これを鋳型とし、各種サイトカインプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、GMM抗原刺激によりIL-10の特異的発現増強が観察された。

D. 考案

結核菌に比してMAC菌においては、感染前にはGMMを産生しないこと、しかしグルコース存在下でのGMM産生能力が極めて高いことから、GMMに対するT細胞応答が感染成立の鋭敏な生物学的指標になると考えられる。初年度の成果として、まず環境常在菌を模したMAC培養系が確立できた。さらにこれをモルモットに接種することにより、GMM特異的T細胞応答が

誘起されることを、in vivo（皮膚応答）および in vitro（リンパ節細胞の RT-PCR）を用いて実証した。

次年度の課題として次の 2 点に取り組むことが肝要と考える。

1) 生体内増殖 MAC 菌が真に GMM を新生することの実証

2) 臨床展開を視野に、GMM 特異的 T 細胞応答をより鋭敏かつ簡便に検出する方法の確立

1) については、MAC 菌感染組織より脂質を抽出し、LC-MS による GMM の検出を行う予定である。また 2) については GMM をロードしたグループ 1 CD1 テトラマーの作製が最優先課題と考えており、現在そのコンストラクトの作製を鋭意進めている。

E. 結論

MAC 感染により GMM が新生され、GMM 特異的 T 細胞応答が誘起されることを実証した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1) Hattori, Y., D. Morita, N. Fujiwara, D. Mori, T. Nakamura, H. Harashima, S. Yamasaki, and M. Sugita. 2014. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. *J. Biol. Chem.* 289(22): 15405-15412.

2) 吉岡佑弥、杉田昌彦 2014. 脂質免疫を基盤とした新しい遅延型アレルギー応答 *臨床免疫・アレルギー科* 62(6): 692-696.

2. 学会発表

国内会議

なし

国際会議

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

非結核性抗酸菌のマクロファージ内での生存戦略の解明

担当責任者 小出幸夫 浜松医科大学 理事・副学長

研究要旨：

本研究ではイメージ解析とプロテオミクスによって、*Mycobacterium avium* complex (MAC) によるマクロファージ内での生存戦略を解明して、MAC 感染症の新たな治療法を提案する。MAC 感染マクロファージで発現しているタンパク質を結核菌感染マクロファージと比較して、MAC 感染によって特異的に発現が増加、減少する宿主タンパク質をプロテオミクスの手法を用いて同定した。*Mycobacterium avium* 104 株 (MAV) を感染させたマクロファージでは sequestosome-1 (p62)、Cis-aconitate decarboxylase (CAD)、myosin-Ig などのタンパク質発現が上昇していることが明らかになった。Myosin-Ig はマイナー組織適合抗原として機能していることが明らかになっている。今後、ヒトマクロファージでも MAV 感染によって myosin-Ig の発現が上昇することが明らかになれば、新しい MAC 感染症治療方法の開発に発展する可能性がある。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) は結核菌の毒力決定因子である ESAT-6、およびその分泌装置である ESX-1 のホモログ遺伝子を有していない。しかし、MAC と同様に ESX-1 分泌装置を欠損している BCG よりも病原性は強い。このことは、MAC は結核菌と異なる生存戦略を採用して、マクロファージ内での細胞性寄生性を発揮していることを示唆する。本研究ではイメージ解析とプロテオミクスによって、MAC によるマクロファージ内での生存戦略を解明して、MAC 感染症の新たな治療法を提案する。

B. 研究方法

MAC 感染マクロファージで発現しているタンパク質を結核菌感染マクロファージと比較して、MAC 感染によって特異的に発現が増加、減少する宿主タンパク質をプロテオミクスの手法を用いて同定した。RAW264.7 マクロファージに BCG、結核菌、MAV 104 株を感染させて、感染 24 時間後にマクロファージ細胞抽出液を得た。この抽出液をトリプシン処理した後、LC-MS/MS によって

網羅的タンパク質同定を行った。タンパク質発現量はペプチドスペクトル量で比較した。

C. 研究結果

RAW264.7 マクロファージに BCG、結核菌、MAV 104 株を感染させて、マクロファージ細胞抽出液を得た。この抽出液をトリプシン処理した後、LC-MS/MS によって網羅的タンパク質同定を行った。タンパク質発現量はペプチドスペクトル量で比較した。解析した結果、LC-MS/MS によって 3465 タンパク質を同定することができた。BCG、結核菌、MAV 感染の全てで発現が上昇するが、特に MAV 感染で発現が上昇したタンパク質として、sequestosome-1 (p62)、Cis-aconitate decarboxylase (CAD)、myosin-Ig が見つかった。p62 はオートファジーアダプタータンパク質として機能することが明らかになっている。我々は、結核菌感染マクロファージでは p62 の発現が上昇するが、Coronin-1a によって感染結核菌はオートファゴソーム形成の標的から逃れることを明らかにしている。MAV によるオートファゴソーム形成阻害機構はこれまで明らかでない。CAD はイタコン酸を合成して、感染結核菌に殺

菌作用を示すことが明らかになっている。イタコン酸による MAV の殺菌機構についても明らかになっていない。Mycosin-Ig はマイナー組織適応抗原である HA-2 のプレカーサーである。

D. 考案

MAV 感染時においてのみ特異的に発現が上昇するタンパク質を見出すことはできなかったが、結核菌感染、BCG 感染時よりも発現量が増加するタンパク質として、p62、CAD、myosin-Ig を見出すことができた。p62 は選択的オートファジーを誘導するタンパク質であり、CAD はイタコン酸を合成して、抗酸菌の殺菌作用に機能することが明らかになっている。Mycosin-Ig はマイナー組織適応抗原である HA-2 のプレカーサーであり、ヒト MAC 感染組織においてもマイナー組織適合抗原の発現が増加していれば、これらのマーカーを標的とした新しい MAC 感染症治療方法の開発に発展する可能性がある。

E. 結論

MAV 感染マクロファージにおいて発現が増加するタンパク質をプロテオミクスによって同定することができた。これらのタンパク質を標的とした新しい MA 感染症治療方法の開発に発展する可能性を提唱できた。

F. 健康危険情報

本研究ではヒト臨床資料および試験を行っていない。

G. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）
 - 1) 瀬戸真太郎、永田 年、堀井俊伸、小出幸夫、2014. 結核菌ファゴソームの分子解剖、日本細菌学雑誌 69(3), 513-525.
2. 学会発表
 - 1) 瀬戸真太郎、小出幸夫、結核の新規病原因子の解明（シンポジウム）、第 90 回日本結核病学会総会、2015 年 3 月、長崎
 - 2) 瀬戸真太郎、小出幸夫、Host-Pathogen Interaction の観点から考え得る新しい治療法（シンポジウム）、第 90 回日本結核病学会総

会、2015 年 3 月、長崎

- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）なし

肺非結核性抗酸菌症の臨床診断法の開発
肺 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 症の予後予測や病勢を評価出来る
宿主側因子（血中指標）および菌側因子の探索

担当責任者 前倉 亮治 国立病院機構刀根山病院 副院長

研究要旨：

肺 MAC 症の予後予測や病勢を評価出来る血中指標の探索、および MAC 菌のゲノム多様性と肺 MAC 症の臨床像との関連性の検討するために、肺 MAC 症患者 299 例を横断的解析し、5 年以上の経過観察で胸部画像所見が安定していた安定例 50 例（16.7%）と複数回の多剤併用化学療法に反応せず病状が悪化する悪化例 40 例（13.4%）を抽出した。これらの患者から検体（血清および MAC 菌）を採取し、血中指標の探索と MAC 菌のゲノム解析を開始した。

A. 研究目的

肺 MAC 症の予後予測や病勢を評価出来る血中指標の探索、および MAC 菌のゲノム多様性と肺 MAC 症の臨床像との関連性の検討

討を行う。また、起因菌のゲノム多様性と肺 MAC 症の臨床像との関連性についても検討する。

B. 研究方法

2006 年から 2014 年まで当院において肺 MAC 症と診断されキャピリア®MAC 抗体が測定されていた 822 例のうち、3 年以上定期的に経過観察された 299 例を対象とした。これらの症例を経過観察例と化学療法施行例の 2 つに大別し、さらに治療介入とその効果を加味し後方視的に分類を行った。299 例から臨床経過が安定した例 (Stable A1) と悪化例 (Progressive C および MAC による死亡例) に分けて抽出した。

E. 結論

肺 MAC 症患者 299 例中横断的解析にて、5 年以上の経過観察で胸部画像所見が安定していた安定例 50 例（16.7%）と複数回の多剤併用化学療法に反応せず病状が悪化する悪化例 40 例（13.4%）が存在した。

C. 研究結果

Stable A1：5 年以上の経過観察で胸部画像所見の著明な悪化が認められない無治療もしくは単剤投与の症例 50 例と、
Progressive C：多剤併用化学療法を複数回施行するも、排菌陰性化せず、胸部画像所見が悪化もしくは死亡した症例 40 例を抽出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*. 2014 Jun;12(2):211-9.

2. 学会発表

【国内会議】

- 1) 非結核性抗酸菌症 (MAC) 症の経過中に多発肺転移を伴い急激に発症増悪した肺腺癌の 1 例. 第 203 回日本内科学会近畿地方会（平成 26 年 3 月 1 日 大阪）
- 2) 関節リウマチに合併した非結核性抗酸菌症

D. 考案

今後これらの症例において血清・尿検体を用いたバイオマーカーを測定し、その差異につき比較検

の臨床像の検討. 第 54 回日本呼吸器学会総会 (平成 26 年 4 月 26 日 大阪)

- 3) 臨床的に問題となる非結核性抗酸菌症血清抗体から診た非結核性抗酸菌症. 第 89 回日本結核病学会総会(平成 26 年 5 月 10 日 岐阜)
- 4) Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC 法) による新規開発試薬の基礎的検討 第 89 回日本結核病学会総会(平成 26 年 5 月 10 日 岐阜)
- 5) 気道検体から *Mycobacterium gordonae* が検出された症例の検討～診断基準との関連について 第 89 回日本結核病学会総会(平成 26 年 5 月 10 日 岐阜)

【国際会議】

- 1) Monotherapy with erythromycin for *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Chest World Congress 2014 (Madrid Spain. March21)
- 2) Clinical Significance of *Mycobacterium Gordonae* Isolates from Respiratory Specimens 32nd World Congress of Internal Medicine 2014, Seoul

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 学会等発表実績

学会等発表実績

委託業務題目「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」

機関名：新潟大学大学院医歯学総合研究科

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
潜在性結核および内因性再燃の検出を目的とした血清診断法の開発 (ポスター)	仁木 満美子、仁木 誠、 松本 壮吉	第87回日本細菌学会 総会	2014年3月26 日-28日	東京
ケニア共和国ワクレ地区小学生を対象とした潜在性結核感染と寄生虫感染の関連。 (ポスター)	尾関 百合子、武田 知芳 里、岡部 真裕子、井上 学、岡 真優子、平山 幸 雄、一瀬 休生、小林 和 夫、松本 壮吉。	第87回日本細菌学会 総会	2014年3月26 日-28日	東京
Mycobacterial DNA-binding protein 1 induces phenotypic tolerance to isoniazid in mycobacteria. (Poster)	Makoto Niki, Mamiko Niki, Mayuko Osada-Oka, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto.	International Union of Microbiological Societies Congresses.	July27- August1, 2014	Canada
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。(口頭)	松本 壮吉	第22回呼吸器疾患・感 染症研究会	2014年8月23 日。	国内
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。(口頭)	尾関 百合子、 松本 壮吉。	中部乳酸菌研究会発表 会。	2014年11月24 日。	国内
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。(口頭)	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。	日本ワクチン学会学術 集会。	2014年12月6- 7日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Whole-Genome Sequence of <i>Mycobacterium kyorinense</i> .	Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Nozaki, E., Pais Ramos, J., Tortoli, E., Yonetani, S., Matsushima, S., Tateishi, Y., Matsumoto, S. and Watanabe,	Genome Announc.	2014	国外
Direct detection of <i>Mycobacterium avium</i> in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification.	Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H. and Matsumoto, S.	J Water Health	2014	国外

学会等発表実績

委託業務題目「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」

Risk Factors and Spatial Distribution of <i>Schistosoma mansoni</i> Infection among Primary School Children in Mbita District, Western Kenya.	Nagi, S., Chadeka, E. A., Sunahara, T., Mutungi, F., Justin, Y. K., Kaneko, S., Ichinose, Y., <u>Matsumoto, S.</u> , Njenga, S. M., Hashizume, M., Shimada, M. and Hamano, S.	PLoS Negl Trop Dis.	2014	国外
Photodynamic Therapy Using Systemic Administration of 5-Aminolevulinic Acid and a 410-nm Wavelength Light-Emitting Diode for Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> -Infected Ulcers in Mice.	Morimoto, K., Ozawa, T., Awazu, K., Ito, N., Honda, N., <u>Matsumoto, S.</u> and Tsuruta, D.	PLoS One.	2014	国外
Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models.	Fujii, Y., Kaneko, S., Nzou, S. M., Mwau, M., Njenga, S. M., Tanigawa, C., Kimotho, J., Mwangi, A. W., Kiche, I., <u>Matsumoto, S.</u> , Niki, M., Osada-Oka, M., Ichinose, Y., Inoue, M., Itoh, M., Tachibana, H., Ishii, K., Tsuboi, T., Yoshida, L. M., Mondal, D., Haque, R., Hamano, S., Changoma, M., Hoshi, T., Kamo, K., Karama, M., Miura, M. and Hirayama, K.	PLoS Negl Trop Dis	2014	国外
結核ワクチン開発の現状と新しい結核ワクチン開発に向けて	松本 壮吉、尾関 百合子	化学療法の領域	2014	国内
抗酸菌の細菌学的特徴と病原性	西内 由紀子、松本 壮吉	感染症内科	2014	国内
結核とその制圧を目指した研究	松本 壮吉	新潟県医師会報	2014	国内

学会等発表実績

委託業務題目「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」

機関名：浜松医科大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
結核の新規病原因子の解明 (シンポジウム)	瀬戸真太郎、小出幸夫	第90日本結核病学会 総会	2015年3月	長崎
Host-Pathogen Interactionの観点から 考え得る新しい治療法 (シンポジウム)	瀬戸真太郎、小出幸夫	第90日本結核病学会 総会	2015年3月	長崎

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」

機関名：国立病院機構 刀根山病院

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
非結核性抗酸菌症(MAC)症の経過中に多発肺転移を伴い急激に発症増悪した肺腺癌の1例 口頭	赤嶺祥真、森 雅秀、里見明俊、新中 学、矢野幸洋、米田 勉、木村裕美、岡田達也、山口俊彦、横田総一郎。	第203回日本内科学会近畿地方会 大阪	平成26年3月1日	
関節リウマチに合併した非結核性抗酸菌症の臨床像の検討 口頭	松井秀記、北田清悟、揚塩文崇、香川浩之、玄山宗到、好村研二、三木啓資、三木真理、森 雅秀、前倉亮治	第54回日本呼吸器学会総会 大阪	平成26年4月26日	国内
臨床的に問題となる非結核性抗酸菌症血清抗体から診た非結核性抗酸菌症。口頭	前倉 亮治。	第89回日本結核病学会総会 岐阜	平成26年5月10日	国内
Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC 法) による新規開発試薬の基礎的検討 口頭	有村 泰晃、齋藤 晴子、吉川 裕之、北田 清悟、前倉 亮治	第89回日本結核病学会総会 岐阜	平成26年5月10日	国内
気道検体からMycobacterium gordonae が検出された症例の検討～診断基準との関連について 口頭	香川 浩之、矢野 幸洋、藤川 健弥、北田清悟、前倉 亮治	第89回日本結核病学会総会 岐阜	平成26年5月10日	国内
Monotherapy with erythromycin for Mycobacterium avium complex pulmonary disease. ポスター	Yano Y, Kitada S, Kuroyama M, Kagawa H, Satomi A, Mori M, Yokota S, Maekura R.	Chest World Congress Madrid Spain.	2014 March21	国外
Clinical Significance of Mycobacterium Gordonae Isolates from Respiratory Specimens ポスター	Yukihiro YANO	32 nd World Congress of Internal Medicine Seoul	2014/10/24-28	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目、口頭、ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Direct detection of Mycobacterium avium in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification.	Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S	J Water Health	2014 Jun	国外

IV. 研究成果の刊行物・別刷・
班会議プログラム等資料

厚生労働科学研究委託費(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)
 非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究
 (H26-新興実用化—一般—006)

2014(H26)年度 第一回研究班 班会議 プログラム

日時:2014年6月16日(月)13:00-16:30

会場:国立感染症研究所 共用第三会議室

発表(所属)		発表課題
1	13:05-13:20 阿戸 学 (国立感染症研究所・免疫部)	概要や方向性 (基礎-臨床医学の橋渡し研究)
2	13:20-14:00 御手洗 聡 (結核研究所・抗酸菌部)	非結核性抗酸菌症の疫学調査
	14:00-14:30 休憩	
3	14:30-14:50 松本 壮吉 (新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野)	非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究 M. kansasiiやM. abscessusなど非結核性抗酸菌症の迅速診断系の確立
4	15:50-15:10 杉田 昌彦 (京都大学ウイルス研究所)	非結核性抗酸菌の脂質代謝と免疫応答
5	15:10-15:30 小出 幸夫 (浜松医科大学)	イメージ解析とプロテオミクスによるMACのマクロファージ内での生存戦略の解明
6	15:30-15:50 大原 直也 (岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・口腔微生物学分野)	抗酸菌における環状ヌクレオチド分子の機能
7	15:50-16:10 前倉 亮治 (国立病院機構・刀根山病院)	肺非結核性抗酸菌感染に対する臨床診断法の開発

- コメント 厚生労働省健康局結核感染症課 梅木和宣 課長補佐
結核予防会結核研究所 名誉所長 森亨先生
- 事務処理に関する説明等

厚生労働科学研究委託費(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)
 非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究
 (H26-新興実用化—一般—006)

2014(H26)年度 第二回研究班 班会議 プログラム

日時:2015年1月19日(月)13:30-16:30

会場:国立感染症研究所 共用第二会議室

発表者(所属)		発表課題
13:40-14:00	阿戸 学 (国立感染症研究所)	研究班の概要と今後の方向性
14:00-14:25	御手洗 聡 (結核予防会結核研究所)	本邦における肺非結核性抗酸菌症の疫学的実態に関する全国調査
14:25-14:50	松本 壮吉 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)	非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究 M. kansasiiやM. abscessusなど非結核性抗酸菌症の迅速診断系の確立
14:50-15:10	休憩	
15:10-15:35	杉田 昌彦 (京都大学ウイルス研究所)	非結核性抗酸菌の脂質代謝と免疫応答
15:35-16:00	小出 幸夫 (浜松医科大学)	イメージ解析とプロテオミクスによるMACのマクロファージ内での生存戦略の解明
16:00-16:25	前倉 亮治 (独立行政法人国立病院機構刀根山病院)	肺Mycobacterium avium-intracellulare complex(MAC)症の予後予測や病勢を評価出来る宿主側因子(血中・尿中指標)および菌側因子の探索

- 事務処理に関する説明等