

第80回総会シンポジウム

Ⅲ. 抗酸菌症研究の最前線

座長 ¹岡田 全司 ²白川 太郎

キーワード：結核，抗酸菌症，基礎研究

シンポジスト：

1. 結核感染症例の SNP 解析

白川太郎（京都大学大学院医学研究科健康増進行動学）

2. MAC 症の疾患感受性遺伝子研究

慶長直人（国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部）

3. 生体の抗酸菌症感受性と結核ワクチン研究

岡田全司（独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）

4. 抗酸菌の病原性に関する分子遺伝学的研究

谷口初美（産業医科大学医学部微生物学教室）

5. 結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子

阿部千代治（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）

6. Toll-like receptor と結核感染

竹田 潔（九州大学生体防御医学研究所発生工学分野）

結核菌を含む抗酸菌に対する宿主側の抵抗性は主として T 細胞免疫によって担われている。事実、HIV 感染症や T 細胞免疫不全（生体の抗酸菌感受性）に伴う結核感染合併が大きな問題となっている。したがって、T 細胞免疫を増強するワクチン療法や免疫療法が理論的のみでなく、実際的にも開発されつつある。

一方、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていなかった。最近、Toll-like receptor (TLR) ファミリーが病原体の構成成分の認識に関与していることが、明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLR ファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を

果たす可能性が考えられる。本シンポジウムでは、竹田潔が自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムを TLR を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を包括的に理解することを目的とし、特に、TLR を介したシグナル伝達機構を中心に解析した。

1998 年、米国 CDC および ACET は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。岡田全司は BCG よりも 100 倍以上強力な結核予防ワクチン効果を示す新しい DNA ワクチン (Hsp 65 DNA + IL-12 DNA ワクチン) やリコンビナント BCG ワクチンを開発した。したがって、さらに岡田全司は結核患者の T 細胞免疫低下解析と T 細胞免疫増強ワクチンの研究成果を中心に、新しい抗結核ワクチンの臨床応用への動きと課題について検討した。

さらに、宿主側の多因子疾患の感受性遺伝子を同定する方法として、多型マーカーとの連鎖不平衡を利用し、大規模な領域を関連解析でスクリーニングする手法が広く検討されている。本研究では、多型性に富むマイクロサテライトをマーカーとして利用し、非結核性抗酸菌症と関連する一塩基多型 (SNP) を同定する研究を慶長直人が発表し、結核菌症と関連する SNP 同定の研究は白川太郎が報告した。本解析により、未だ確実な方法論のない疾患感受性候補領域の絞り込みから感受性遺伝子の同定に至る戦略を確立し、それをシステム化することで、今後、抗酸菌症の疾患感受性遺伝子の同定が可能となると期待される。

一方、抗酸菌側から見た薬剤抵抗性や宿主の免疫力に対する抵抗性について、阿部千代治は抗酸菌における

¹独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター、²京都大学大学院医学研究科健康増進行動学

連絡先：岡田全司，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市長曾根町 1180 (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)
(Received 19 Jul. 2005)

種々の薬剤感受性遺伝子の長年にわたる解析をクリアーカットに講演した。また最近、谷口初美は結核菌の mIHF およびその近傍遺伝子の放線菌の遺伝子との類似性に着目し、これらの遺伝子が抗酸菌の増殖や phase variation に与える影響を明らかにしつつある。これによ

り休眠状態への変換機序を明らかにする手掛かりを得たことより、今まで不明であった、結核菌が宿主の抵抗性をエスケープするメカニズム解明につながる研究が紹介された。

1. 結核感染症例の SNP 解析

京都大学大学院医学研究科健康増進行動学 白川 太郎

1. はじめに

Common disease あるいは多因性疾患と呼ばれる糖尿病、虚血性心疾患、高血圧といった疾患の病態形成においては遺伝要因が重要であることが広く認識されている。結核などの感染症も例外ではなく、その発症には宿主側の環境衛生・生活栄養状態といった要因に加え、免疫反応に影響をもたらす遺伝要因が深く関わるものがこれまでに強く示されてきた。特筆すべきは、近年、非定型抗酸菌や BCG による致死性の重症感染をきたした家系や小児患者群から、インターロイキン-12 (IL-12) およびインターフェロン- γ (IFN- γ) といった TH1 免疫反応の中心を担うサイトカイン関連遺伝子の欠損・変異が相次いで見出された点である。これら一連の報告により、著しい TH1 活性の低下が抗酸菌症をはじめとした細胞内寄生性病原体への選択的易感染性をきたすことが明らかとなり、“Mendelian susceptibility to mycobacterial disease” (MSMD; MIM) という新たな疾患概念が確立されるに至った。

2. 結果

これらの知見をふまえ、われわれは独自の多型解析の結果、IL-12 受容体 β 1 鎖 (IL12RB1) に 3 カ所のミスセンス多型があることを見出し、そのリスクアレルが IL-12 (および IL-23) の受容体に対する反応性を低下させ、最終的に IFN- γ を介した TH1 免疫反応が減弱することで結核感染への感受性に寄与していることを報告した。また、その後のわれわれの行った関連解析では他の TH1 反応に関連した候補遺伝子については結核感染との相関は認めなかった。

一方で、ヒトやマウスのゲノム情報の整備に伴い、これまで様々な遺伝解析手法を駆使して抗酸菌感染症の感受性遺伝子 (座) の同定が試みられてきた。代表的に用いられてきたのは、3つの手法、すなわち①動物モデルを使った解析、②候補遺伝子アプローチ、③全ゲノム連鎖解析、である。マウスの解析から同定された例として

は、*Nramp1* がよく知られており、その後の患者対照研究でも、ヒトにおける *NRAMP1* の遺伝子多型と結核との強い相関が確認されている。ノックアウトマウスの解析からも宿主の感染防御に関わる遺伝要因の研究が進められており、例えば IL-12 欠損マウスは BCG や結核感染により感受性が高いことが知られている。関連解析を用いた研究からは *NRAMP1* 以外の有力な候補遺伝子として、MHC class II, vitamin D receptor (VDR), mannose binding lectin (MBL), IL1RA/IL1B, IL12RB1 などが報告されている (Table 1)。また全ゲノム連鎖解析によって、主として 2q35 (*NRAMP1* 領域)、15q11-13, Xq27 の 3 領域が結核と連鎖のある遺伝子座として同定されている。しかし、これまでに見出されたこれらの候補遺伝子は結核感染における宿主側の全遺伝要因の一部を説明しているにすぎず、今後さらなる結核感受性遺伝子同定へ向けての幅広い研究が必要である。

このような状況を踏まえてわれわれは、すでに発表された結核の感受性遺伝子 11 個における 18 SNP についてわれわれのサンプルを用いて検討を行うこととした。サンプルは和歌山のサンプル、東京のサンプル、九州のサンプルの、3 地域のサンプルを用い合計 764 名、各々の地域での正常対照を用いて解析を行った。その結果、*NRAMP1* 遺伝子 (GT と SNP) と IL12RB1 遺伝子に関連を認めたが、すべてのサンプルにおいて関連を認めたのは、*NRAMP1* 遺伝子内の SNP のみであった。これらの結果は、すでに発表された論文の結果と一致するもので、現在世界で人種を超えて関連を認めている遺伝子は *NRAMP1* のみである。しかしながら、その機能的な意味は現在のところ不明である。

結核感染の特殊な例として、薬剤耐性の問題が次にあげられるが、本来この問題は、結核菌側の問題として処理されてきた。しかし、集団発生例において、一部に薬剤耐性が生じることから、一部には宿主側の問題もあると考えられる。そこで、薬剤耐性を獲得した症例においてどのような遺伝子が関与するかの検討が必要と考えられた。

Table Relationship between tuberculosis and candidate genes in many populations

Candidate gene	Chromosome	Allelic gene/Polymorphism	Population	Sample (patients/normal)	Odds ratio /p value	Reference
IL10	1q31-q32	- 1082A→C	Gambian	358/106	1.8 (1.2-2.9)	1)
IL1RA/IL1B	2q14-14.2	IL1RA A2-/IL1B (+3953) A1+	Gujarati Asian	54/65	0.028	2)
IL1RA	2q14-14.2	allele2	Gambian	>400/400	0.03	3)
NRAMP1	2q35	INT4 C + 3' UTR del	Gambian	410/417	4.1 (1.9-9.1)	4)
NRAMP1	2q35	3' UTR	Korean	192/192	1.8 (1.1-3)	5)
NRAMP1	2q35	5' (GT) n, Asn543Asp	Japanese	267/202	1.9 (1.3-2.6)	6)
NRAMP1	2q35	INT4 C	Guinea-Conaky	44 pedigree	<0.04	7)
IL8	4q13-q21	- 251T→A	White/African American	167/180	3.5 (1.5-8.1)	8)
IL12B	5q31.1-q33.1	(ATT) ₈	Hong Kong Chinese	516/514	2.1 (1.5-3.2)	9)
HLA class I	6p21.3	A1, Cw6, Cw7	Indian	235/289	<0.001	10)
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	North Indian	20/46	4.8 (1-23.3)	11)
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	South Indian	126/87	2.7 (1.3-5.9)	12)
HLA-DRB1	6p21.3	DRB1*1501	Mexican	50/95	7.9 (2.7-23.1)	13)
HLA-DQB1	6p21.3	DQB1*0503	Cambodian	78/49	0.005	14)
MBL	10q11.2-21	R52C, G54D, G57Q	Indian	202/109	0.008	15)
MBL	10q11.2-21	G54D	South African	91 (64) /79	<0.017 (<0.002)	16)
SP	10q22-q23	1A ³	Mexican	107/101	9.3 (1.6-53.4)	17)
VDR	12q12-14	codon352 (tt)	Gambian	408/414	0.01	18)
VDR	12q12-14	Fok I ff or undetectable VD	Gujarati Asian	71/42	5.1 (1.4-18.4)	19)
IFNG	12q14	874A→T	South African	313/235	0.0055	20)
P2X7	12q24	- 762T→C	Gambian	323/347	0.55 (0.32-0.93)	21)
IL12RB1	19p13.1	R214-T365-R378	Japanese	98/197	2.5 (1.2-5.0)	22)
IL12RB1	19p13.1	- 2C→T	Moroccan	101 pedigree	2.7 (1.2-6.1)	23)

IL1RA, IL-1 receptor antagonist; NRAMP1, natural resistance-associated macrophage protein 1 (SLC11A1); MBL, mannose binding lectin; SP, surfactant protein; VDR, vitamin D receptor; IFNG, IFN- γ ; P2X7, P2X7 purinergic receptor; IL12RB1, IL-12 receptor β 1

1) Delgado et al. J Infect Dis, 2002. 2) Wilkinson et al. J Exp Med, 1999. 3) Bellamy et al. Tuber Lung Dis, 1998. 4) Bellamy et al. N Eng J Med, 1998. 5) Ryu et al. Int J Tuberc Lung Dis, 2000. 6) Gao et al. Clin Genet, 2000. 7) Cervino et al. Ann Hun Genet, 2000. 8) Ma et al. J Infect Dis, 2003. 9) Tso et al. J Infect Dis, 2004. 10) Balamurugan et al. J Infect Dis, 2004. 11) Mehra et al. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1995. 12) Ravikumar et al. Tuber Lung Dis, 1999. 13) Teran-Escandon et al. Chest, 1999. 14) Goldfeld et al. JAMA, 1998. 15) Selvaraj et al. Tuber Lung Dis, 1999. 16) Hoal-Van Helden et al. Pediatr Res, 1999. 17) Floros J et al. J Infect Dis, 2000. 18) Bellamy et al. J Infect Dis, 1999. 19) Wilkinson et al. Lancet, 2000. 20) Rossouw M et al. Lancet, 2003. 21) Li et al. J Infect Dis, 2002. 22) Akahoshi et al. Hum Genet, 2003. 23) Remus et al. J Infect Dis, 2004.

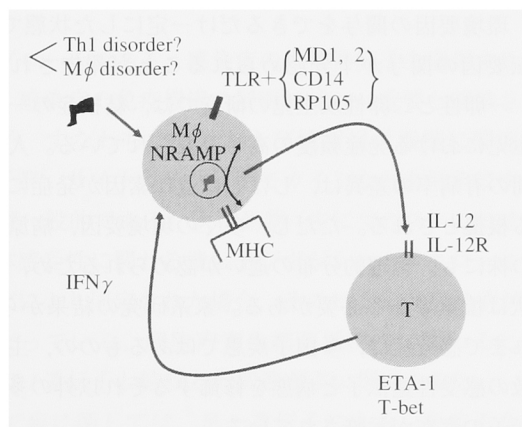


Fig. 1 Cells and genes in the process of degradation of *M. tuberculosis*

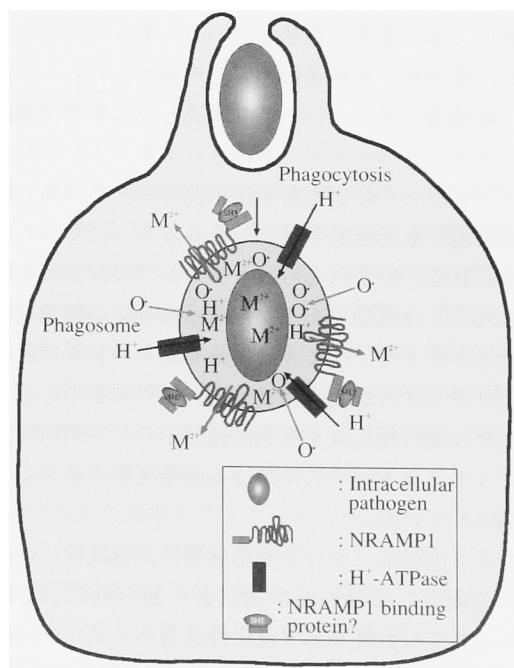


Fig. 2 Role of NRAMP1 in the phagosome (hypothesis): NRAMP1 play a role of proton influx-efflux, and regulate *M. tuberculosis* requiring O₂.

以上のような状況を踏まえて、結核患者において薬剤耐性現象が生じる理由として、

- (i) 結核菌に対する感受性あるいは耐性が異なると考える
- (ii) 結核菌への感受性は同じであるが、単に薬剤への感受性が異なる

以上の2つが考えられる。この2つの仮説のどちらが正しいかを解決するには、

- (i) これまでの感受性遺伝子群について解析を行う
- (ii) 薬剤感受性については、全ゲノムで解析を行う

以上2つの作業を行うことで解決が可能であると考えられる。

3. まとめ

上記の討議を踏まえて解析を行っており、結核感受性遺伝子群では、*NRAMP1*のSNPパターンに違いが見られる可能性があり、また耐性結核患者との比較でもこの遺伝子のみが関連すると考えられる。この理由として細胞内処理の違いが関係する可能性があることが認められた。

2. MAC症の疾患感受性遺伝子研究

国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 慶長 直人

はじめに

免疫関連遺伝子変異研究によって、感染の成立、発症、病型にどれだけの遺伝子多型がどの程度関与するかが明らかになれば、難治であるヒトMAC症など抗酸菌感染症の新たな予防、治療戦略へ道が開けるものと期待される。動物モデルや細胞生物学的な研究により、抗酸菌症研究は、大きな進歩を遂げたが、複雑な人における感染症の病態を解析する有効な手段は未だに限られており、遺伝子多型を用いたアプローチは、まさに人を対象とするその直截性と解析方法の客観性の点から、抗酸菌症研究においても、重要な位置を占めつつある。

今日、感染症の免疫遺伝学研究が盛んに行われる背景には、候補遺伝子アプローチの基礎となる多型情報が十分、公共データベース上に蓄積されてきたこと、ゲノムワイドアプローチによる新規疾患関連遺伝子の局在の推定が技術的にも比較的手軽に行われるようになったことがあげられる。いずれも、ヒトゲノムプロジェクトの発展がもたらした産物である。抗酸菌感染症の候補遺伝子は、サイトカイン、ケモカインやそれらのレセプターなどオーソドックスな免疫関連分子、マウスを中心とした動物モデルから得られた疾患関連分子のヒト相同性遺伝子、ノックアウトマウスにおける感染実験の結果などから選択されている。

そもそも感染症における疾患感受性、抵抗性に関連する遺伝素因として最も医学的によく知られている事例は、マラリア抵抗性を示す遺伝性異常ヘモグロビン症であろう。遺伝的に異常のあるヒトの赤血球は、マラリア原虫にとって、感染、生育しづらい環境を与えることになる。この例は、遺伝要因が感染症の発症に対して、ときとしてきわめて顕著な働きを示すことがあること、ま

た遺伝子変異の選択圧として感染症が大きな役割を果たしてきたことを推測させるものである。

このような特殊な例だけでなく、おそらく一般集団においても、宿主側の遺伝要因が、感染症の疾患感受性に重要な役割を果たすものと推測されている。多くの感染性疾患では家族内集積の傾向が見られる。遺伝要因が存在すれば、一般人口における発症危険率に対して、発症者の同胞に同一疾患が発症する危険率(λ_s)が高くなる。たとえば、1型糖尿病や、多発性硬化症などではこの値は15~20くらいとされている。感染症では、同一家族内では、同一環境で、同一病原体へ曝露されやすいことから、 λ_s は過大評価されやすいものの、多くの場合、1近くから10程度と考えられている。

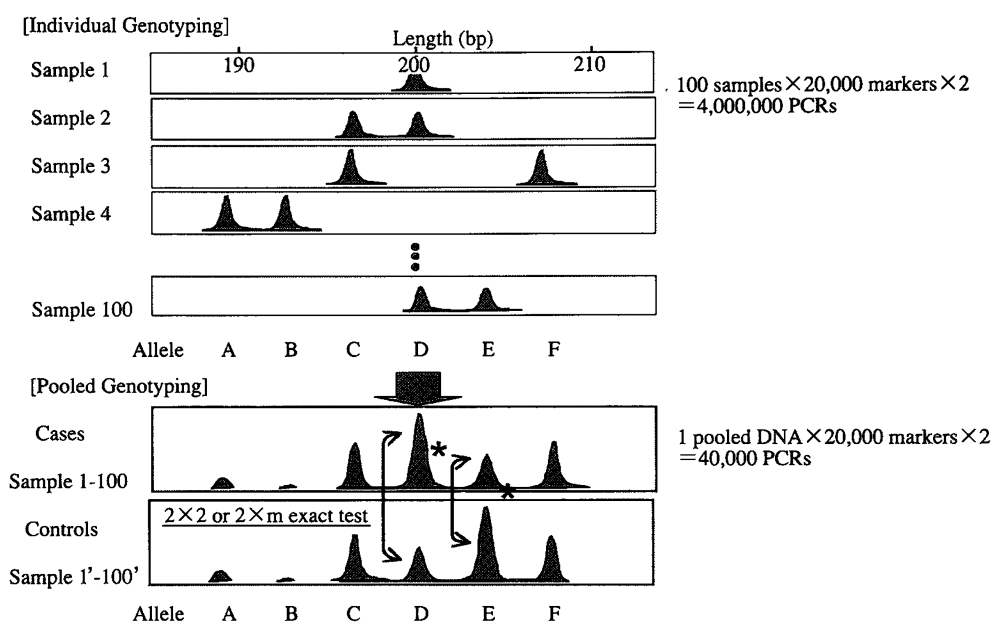
感染症発症に関する双生児研究や養子研究においては、環境要因の関与をできるだけ一定にした状態でも、遺伝要因の関与が十分認められることが報告されてきた。一卵性と二卵性双生児の研究では、結核症の一卵性双生児における発症頻度の高さが知られている。人種集団間の有病率の差異は、しばしば遺伝素因が発症に関与する根拠とされる。ただし、多くの環境要因、病原微生物の株にも、地理的分布の違いが認められるため、この解釈は慎重である必要がある。家系研究の結果からは、これまで感染症は、多因子疾患ではあるものの、主要な少数の感受性遺伝子と病態を修飾するそれ以外の多くの遺伝子の存在が示唆されている。

MAC症の候補遺伝子アプローチ

感染症の疾患感受性遺伝子研究として、急速に発展し、現在でも、最も頻繁に行われている手法は、候補遺伝子の遺伝子多型頻度を症例対照群間で比較して、関連解析により、疾患感受性、抵抗性を明らかにしようとする

Table Search for predisposing factors in pulmonary MAC disease

A. Candidate gene	
Sporadic pulmonary MAC disease	
(1)	HLA-DR6 (Takahashi M, et al.; Kubo K, et al.; AJRCCM. 2000)
(2)	<i>NRAMP1</i> (our study)
Familial mycobacterial disease	
(1)	IFN γ -receptor 1 (Newport MJ, et al.; NEJM. 1996)
(2)	IFN γ -receptor 2 (Dorman SE, et al.; JCI. 1998)
(3)	STAT1 (Dupuis S, et al.; Science. 2001)
(4)	IL-12 p40 subunit (Picard C, et al.; AJHG. 2002)
(5)	IL-12 receptor β 1 (Altare F, et al.; de Jong R, et al.; Science. 1998)
B. Genome-wide search for predisposing genes	

**Fig.** Principle of pool typing of microsatellite markers

るアプローチである。感染症の候補遺伝子を選択する際には、感染症の免疫機構の解明に伴い、重要と認識された分子、すなわち、HLAおよび抗原提示機構に関連する分子群、サイトカイン、ケモカインなどを対象にすることが一般的である。次に動物（主にマウス）における病原体感受性に関わる遺伝子がポジショナルクローニングなどにより同定された場合、そのヒト相同遺伝子が候補になっている。細胞内寄生細菌抵抗性に関わるヒト *NRAMP1* 遺伝子と結核との関連がよい例である²⁾。

MAC症に関しては、単一遺伝子による、免疫不全を伴う全身性播種性のMAC感染症の家系が国外から報告されている (Table)。Th1 サイトカインに関連した遺伝子の異常によるものがほとんどである。このことは、MAC症においても、結核その他の肉芽腫性疾患同様、Th1系免疫応答が感染防御に重要な役割を果たしていることを示している。

一方、明らかな全身免疫異常を伴わない、中高年女性に多く見られるMAC症孤発例について、症例を集積して、症例対照研究の形で、候補遺伝子の遺伝子多型の頻度が、症例群に有意に高い (疾患感受性)、有意に低い (疾患抵抗性) ことを検討している報告は、限られている。オッズ比2程度までの弱い関連を示す遺伝子多型の有意差を再現性よく検出するには、それに相応したサンプル数が必要である^{3)~6)}。MAC症においては、HLA-DR6との関連が報告されているが、検討は必ずしも十分ではなく、多重比較の補正の問題をクリアしたとしても、DR6自体の機能が、MAC症発症と関連するのか、HLA領域にあるHLA遺伝子以外の免疫関連遺伝子が、MAC症の疾患関連遺伝子となっているか、不明な点は多い。

MAC症と候補遺伝子との関連性

われわれは、国立病院機構東京病院との共同研究によ

り、2001年より、MAC症の候補遺伝子関連解析を開始して、これまで、自然抵抗性関連マクロファージ蛋白 (NRAMP1)、ビタミンDレセプター (VDR)、マンノース結合レクチン (MBL) など、結核症ですでに関連が報告されたことのある主な遺伝子多型について、症例111例、対照177例で検討を行い、NRAMP1遺伝子多型とMAC症との間に有意な関連を認めた(田中:投稿準備中)。

MAC症とゲノムワイド関連解析

われわれは、さらに国立病院機構近畿中央胸部疾患センターを中心とした多施設研究によって得られた300症例のMAC症検体を用いて、東海大学猪子英俊教授との共同研究により、同教授の開発された pooled samples による、約2万マーカーのゲノムワイドマイクロサテライト関連解析を実施した (Fig.)。3段階のスクリーニングにより、抽出された43マーカーについて、現在、individual typing を行っている。有意なマーカーが得られれば、その周辺にMAC症感受性遺伝子の存在が期待される。

おわりに

抗酸菌感染症の疾患感受性、抵抗性に影響を与える遺伝因子の詳細は、まだ十分に解明されたとはいえず、現在、他の多因子疾患同様、罹患同胞対解析やゲノムワイド関連解析などの方法が試行されている。感染症関連遺伝子多型の解明は、現存の生物が病原微生物に対する防御機構を進化させてきた道のりをたどる研究でもあり、その長期にわたる攻防を垣間見ることにより、これまでに予想されなかった、新たな予防、治療法が開ける可能性もあり、今後の進展が期待される。

謝 辞

本研究の一部は、以下の方々との共同研究であります。深謝の気持ちとともに、英文原著作成時には、別途、ご連絡させていただきますことを申し添えます。

¹J. Shojima, ¹G. Tanaka, ¹I. Matsushita, ²Y. Inoue, ²K.

Suzuki, ²M. Sakatani, ²M. Okada, ²K. Kimura, ³E. Toyoda, ³N. Kobayashi, ³K. Kudo, ⁴H. Nagai, ⁴A. Kurashima, ⁵A. Kajiki, ⁶N. Oketani, ⁷H. Hayakawa, ⁸T. Shirakawa, ⁹M. Tamari, ¹⁰K. Nakata, ¹¹A. Oka, ¹¹S. Ando, ¹¹G. Tamiya, ¹²T. Sasazuki, ¹¹H. Inoko

¹Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan; ²National Hospital Organization (NHO) Kinki-Chuo Chest Medical Center; ³Division of Respiratory Disease, International Medical Center of Japan; ⁴NHO Tokyo Hospital; ⁵NHO Ohmuta Hospital; ⁶NHO Nishi-Niigata Chuo Hospital; ⁷NHO Tenryu Hospital; ⁸Kyoto University Graduate School of Public Health; ⁹The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN); ¹⁰Niigata University Medical and Dental Hospital; ¹¹Division of Molecular Life Science, Department of Genetic Information, School of Medicine, Tokai University; ¹²International Medical Center of Japan

文 献

- 1) Cooke GS, Hill AV: Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 967-977.
- 2) Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al.: Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med.* 1998; 338: 640-644.
- 3) Tanaka E, Kimoto T, Matsumoto H, et al.: Familial pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1643-1647.
- 4) Huang JH, Oefner PJ, Adi V, et al.: Analyses of the NRAMP1 and IFN-gammaR1 genes in women with *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 377-381.
- 5) Kubo K, Yamazaki Y, Hanaoka M, et al.: Analysis of HLA antigens in *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1368-1371.
- 6) Takahashi M, Ishizaka A, Nakamura H, et al.: Specific HLA in pulmonary MAC infection in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 316-318.

3. 生体の抗酸菌症感受性と結核ワクチン研究

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 岡田 全司

はじめに

いまだに世界の人口の3分の1が結核菌の感染を受け、その中から毎年800万人の結核患者が発生し、200

万人が死亡している、最大の感染症の1つである。

結核菌に対する宿主側の抵抗性は主としてT細胞免疫によって担われている。事実、HIV感染症やT細胞免疫不全(生体の抗酸菌感受性)に伴う結核感染合併が大きい

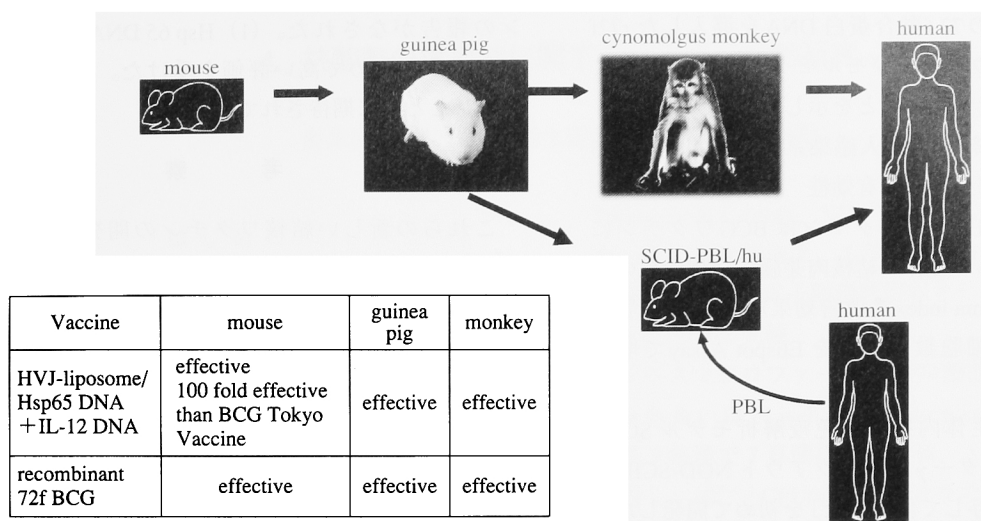


Fig. The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

Table Survival of cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine

Vaccination	Total monkeys	Survival	% Survival
HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	4	2	50
Recombinant 72f BCG	4	3	75
BCG Tokyo	4	2	50
Saline	4	0	0

Cynomolgus monkeys (4 monkeys/group) were immunized three times (every 3 weeks) with (1) HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine, (2) r72f BCG vaccine, (3) BCG Tokyo and (4) saline as control group as described in Section 2. One month after last immunization, M. TB (Erdman strain 5×10^2) was challenged by intratracheally instillation. Survival was studied more than 14 months.

な問題となっている。したがって、T細胞免疫を増強するワクチン療法や免疫療法が理論的のみでなく、実際的にも開発されつつある^{1)~4)}。

1998年、米国CDCおよびACETは新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりも100倍以上強力な結核予防ワクチン効果を示す新しいDNAワクチン(Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン) やリコンビナント72f BCG ワクチンを開発した(Fig.)。したがって、結核患者のT細胞免疫低下解析とT細胞免疫増強ワクチンの研究成果を中心に、新しい抗結核ワクチンの臨床応用への動きと課題について検討する。

方法と結果

[A] 生体の結核菌抵抗性

CD8⁺T細胞が結核菌で感染したMφをFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている。このキラーTの顆粒内の蛋

白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。

多剤耐性結核患者末梢血リンパ球をPPDで4日刺激して、リンパ球のgranulysin mRNAをRT-PCRにて定量した。その結果多剤耐性結核患者では健康人に比し著明な低下が認められた。また、糖尿病合併の難治性結核ではキラーT細胞低下例が認められた。

[B] 結核ワクチン

[I] HVJ-liposome/Hsp 65 DNA + IL-12 DNA ワクチン

マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない(Table)。われわれは① Hsp 65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-liposomeベクター)のワクチンはBCGよりも100倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。このワクチンはキラーTの分化を増強しIFN- γ , IL-2, IL-6の産生を増強した。

[治療ワクチン]さらに、Hsp 65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。欧米では治療ワクチンは未開発。

[II] リコンビナント72f BCG ワクチン

Mtb 39と Mtb 32の72f融合蛋白 DNAを導入した r72f BCG ワクチンはマウスおよびモルモットの系で BCG よりも強力なワクチンであることを示した。

[III] モルモット (結核菌吸入感染系) を用いた Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの有効性

Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは BCG ワクチンに比較して有意差をもって肺の結核肉芽腫, 病理所見の改善を認めた (granuloma index の改善効果)。結核菌に特異的な IFN- γ 産生 T 細胞数の増強を Elispot Assay で明らかにした¹⁾²⁾。

[IV] 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu (IL-2レセプター γ 鎖ノックアウト NOD-SCID にヒト PBL も i.p 投与して作製した) を初めて開発した。これを用いても HVJ-liposome/Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン効果を解析中である。

(1) 新しいヒト生体内結核免疫解析モデル

SCID-PBL/hu (ヒト結核菌ワクチン解析モデル) を用いた評価: 世界に先駆け, 結核蛋白に特異的なヒトキラー T 誘導を示す画期的な, ヒト結核ワクチン効果評価モデルを開発した²⁾。ESAT-6 ペプチドを投与し, これに特異的で HLA-A2 拘束性を示すヒトキラー T を生体内で誘導することに初めて成功した (Fig.)。

(2) 新しい結核ワクチンの臨床応用

さらに, ヒトの結核感染モデルに最も近い折り紙つきのカニクイザル (Nature Med. 1996) の結核感染モデルを用い, HVJ-liposome/Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン, r72f BCG ワクチンの有効性を得た¹⁾²⁾⁵⁾。カニクイザルに3回免疫し, 最終免疫4週後にヒト結核菌 Erdman 株を経気道投与した。体重, 体温, 血沈, 胸部 X 線, ツ反および生存率を解析し1年以上経過観察した。これらの群ではワクチン抗原に対する末梢血リンパ球増殖反応およびサイトカイン産生の増強が認められた。また, 胸部 X 線所見, 血沈の改善効果, 体重減少の阻止効果が認められた。さらに延命効果も認められた。すなわち, Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群および r72f BCG ワクチンは著明な延命効果を認めた (Table)³⁾。Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質 (Anderson 博士ら) ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) も clinical trial が近い将来考えられている¹⁾。しかしながら, 最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる。最も有力なものとして, ① Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン, ② r72f BCG ワクチン, ③ 72f fusion 蛋白 ワクチン (すでに phase I clinical trial) + BCG 東京があげられる。

[VI] WHO STOP TB VACCINE Meeting

2004年4月にWHO会議が開催され新しい結核ワクチ

ンの報告がなされた。(1) Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはきわめて高い評価を受けた。(2) r72f BCG ワクチンとともに期待されている。

考 察

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING に選出された。われわれの Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンが高く評価された (Table)。当センターは呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり, 日本の結核患者数の約50%の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い, Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンおよび r72f BCG ワクチンの臨床応用を計画している。

謝 辞

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター; 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 井上義一, 武本優次, 坂谷光則, 自治医大; 吉田博士, ハーバード大; Mulligan 教授, Lee 博士, 長崎大; 山田, 大原, 内藤各博士, 阪大; 金田教授, 東大; 斎藤博士, Corixa 研究所; Reed, Skeiky, Gillis 各博士, Leonard Wood 研究所; Gelber, Tan, Cruz 各博士, Texas A & M 大学; McMurray 博士らとの共同研究。厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業の支援を受けた。

文 献

- 1) 岡田全司: 結核感染とサイトカイン. 医学のあゆみ. 2004; 209-213.
- 2) 岡田全司: 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラー T リンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット-DNA-リコンビナント BCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]. 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書. 2004; 1-128.
- 3) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2002; 171-175.
- 4) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Pro Nat Acad Sci USA. 1981; 78: 7718-7721.
- 5) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine. 2005; 23: 2132-2135.

4. 抗酸菌の病原性に関する分子遺伝学的研究

産業医科大学医学部微生物学教室 谷口 初美

はじめに

結核菌の増殖に関する因子およびその遺伝子に関しては既に多くの報告がある。また菌の休眠状態に関する増殖制御系の遺伝子群の報告も近年相次いでいる。

われわれは放線菌 *Streptomyces kasugaensis* の *orf3*, *orf5* 遺伝子が増殖の制御に関する遺伝子で、結核菌の *mIHF*, Rv1390 とアミノ酸レベルで高いホモロジーを有するという情報を得た (from K. Akagawa, personal communication)。そこで結核菌の integration host factor (*mIHF*) とその近傍遺伝子を *Mycobacterium smegmatis* J15CS 株に導入し、これらの遺伝子が J774 細胞内での *M. smegmatis* の増殖を制御するという現象を見出したので報告する。

材料と方法

(1) 形質転換体作成

大腸菌・抗酸菌シャトルベクターとして、pYT 923¹⁾ に hygromycin 耐性を組み込んだ改良型の pYT 923hyg α を、宿主には *M. smegmatis* J15CS 株を用いた。ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv の *mIHF*, *mIHF-gmk-Rv1390* 遺伝子を含む断片をベクター pYT923hyg α に挿入し、これら組換え体を *M. smegmatis* J15CS 株に形質転換して、J15CS/pYT 923hyg α , J15CS/*mIHF*, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* を得た。

(2) *In vitro* 実験

普通寒天培地での培養と Ziehl-Neelsen 染色を行った。

Tween 80 加 L-broth, 37°C で培養し、増殖曲線を作成した。普通寒天培地上, 7 日培養のコロニーについては、走査型、透過型電子顕微鏡観察を行った。

(3) *Ex vivo* 実験

マウスマクロファージ系 J774 細胞を Lab-Tek chamber slide あるいは 24 well plate に monolayer に調整した。普通寒天培地で 7 日間培養した後, 5 μ m のフィルターでろ過し, 10⁶~7 CFU/well 感染させた。3 時間食菌後, 2 回洗浄し, amikacin 200 μ g/ml 加 RPMI 1640 medium でさらに 2 時間培養し, 細胞外の菌を殺菌した。medium 交換後, 5%CO₂ incubator で 37°C 3 日間培養した。Ziehl-Neelsen 染色と細胞内生菌数を計測した。また *M. smegmatis* J15CS/pYT 923hyg α , J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の感染 2 日目の細胞について透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

M. smegmatis J15CS, J15CS/pYT 923hyg α , J15CS/*mIHF*, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の普通寒天培地上でのコロニーの大きさ, Ziehl-Neelsen 染色による菌の大きさ, 抗酸性, 液体培地での増殖曲線に差はなかった (Fig. 1)。走査型電子顕微鏡像に違いは認められなかったが, 透過型電子顕微鏡で菌体内微細構造を観察した結果, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の細胞壁の内側が肥厚していた。

J774 細胞感染直後の取り込みに差はなかった。しかし 1 日培養後には J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* 以外の形質転

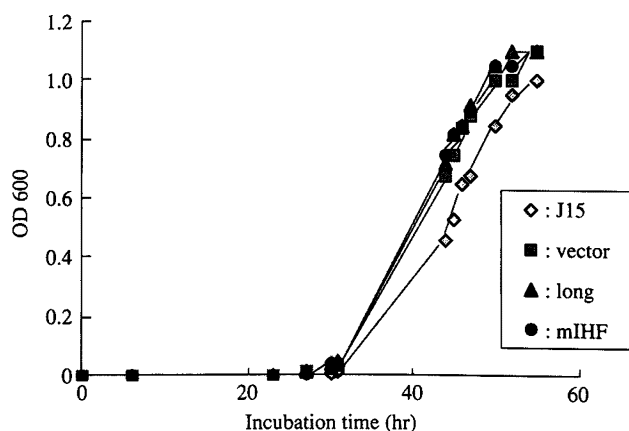


Fig. 1 Proliferation curve (Tween 80 containing L-broth)

J15: *M. smegmatis* J15CS, vector: J15CS/pYT923hyg α , long: J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*, mIHF: J15CS/*mIHF*

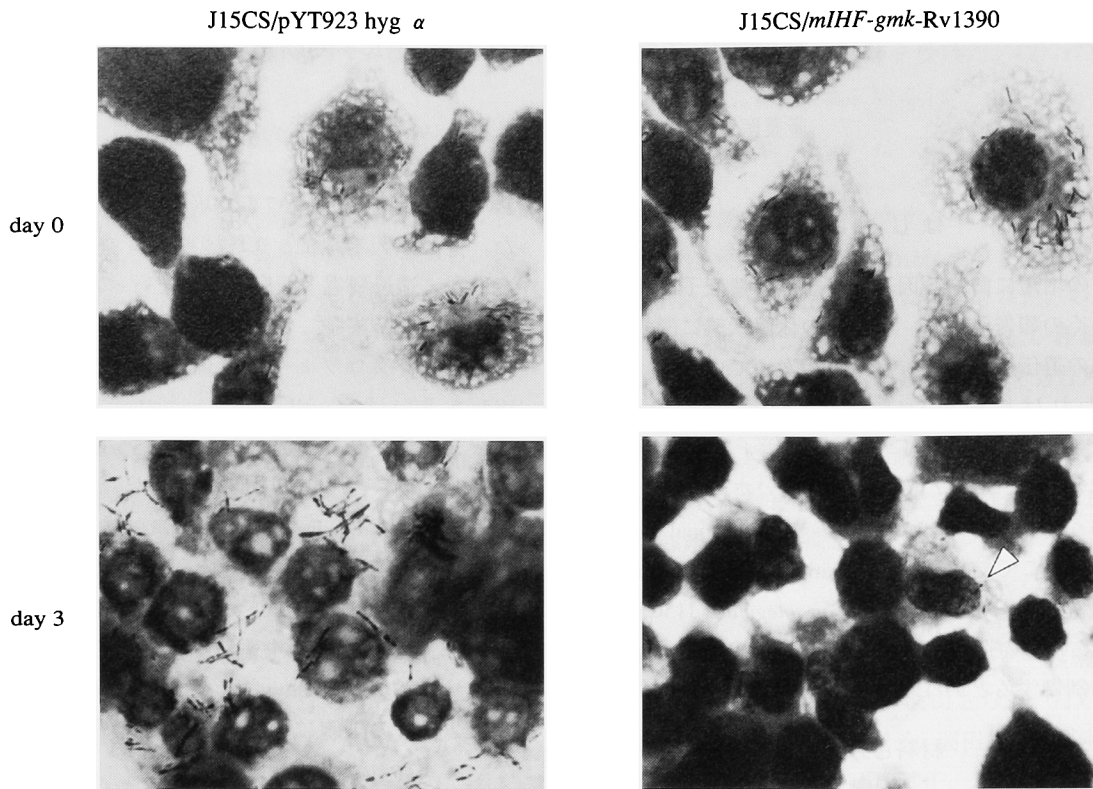


Fig. 2 Proliferation of bacteria in J774 cells (Ziehl-Neelsen staining)

換体は菌の伸長が認められ、細胞内で生残し、明瞭な抗酸性を示していたが、J15CS/mIHF-gmk-Rv1390は菌の伸長が認められず、抗酸性も低下していた。3日目にはこの差は顕著であった。また宿主のJ774細胞も変化していた (Fig. 2)。J15CS/pYT 923hyg α 、J15CS/mIHF-gmk-Rv1390を透過型電子顕微鏡で観察した結果、菌がJ774細胞の食胞内に取り込まれている像が認められた。J15CS/pYT 923hyg α は小さな食胞内に正常な菌が観察された。しかしJ15CS/mIHF-gmk-Rv1390は大きな食胞内に変化した菌が認められた。菌体内に膜様構造の形成が認められ、電子密度の低い内容構造が見られた。しかし、これらの細胞内生菌数を計測した結果、差は認められず、J15CS/mIHF-gmk-Rv1390はJ774細胞内で生残していることが確認された。

考 察

M. smegmatis J15CSはJ774細胞のみでなく、ヒト肺胞上皮細胞であるA549細胞でも取り込まれ、生残した。しかし、小川培地で培養した菌は容易に殺菌され、生残するためには感染させる時の菌の状態が重要であった。遺伝学的背景が同じ結核菌であっても、感染性が異なることが知られており、ヒト側の感受性遺伝子の解析等が行われているが、菌側の要因として、この現象の解明は貴重な情報を提供すると考えられる。

結核菌のmIHF-gmk-Rv1390の3つの遺伝子を破壊することなく*M. smegmatis* J15CSに挿入したものは、*in vitro*では差がなかったが、電子顕微鏡では細胞壁の内側が肥厚している像が観察された。この部位は結核菌の細胞壁のペプチドグリカン層の位置であった。この物質については現在解析中である。

J774細胞、A549細胞内増殖に関しては、3日目にはmIHF-gmk-Rv1390を有する菌は空洞内で休眠状態になった結核菌の像と酷似していた。透過型顕微鏡による微細構造では、J15CS/pYT 923hyg α は狭い食胞内に正常な菌体が認められ、細胞内寄生性細菌であるレジオネラが細胞内で分裂・増殖している時の像に似ていた。しかしJ15CS/mIHF-gmk-Rv1390の場合は、食胞が広く、その中にある菌は菌体内構造が変化し、膜様構造が形成されているものがあった。

*S. kasugaensis*のORF5はRNA polymeraseの ω subunitであると報告されている²⁾。 ω subunitはRNA polymeraseの立体構造維持に重要な役割をしており、 σ factorとの相互作用にも影響を与えるものである。ストレス下では ω subunitに変化が生じ、 σ factorも定常状態とは異なるものが選ばれ、合成されるmRNAも異なってくると思われる。結核菌のRv1390タンパクは*S. kasugaensis*のORF5と高い相同性を示し、結核菌の ω subunitではないかと考えられる。一方、mIHFタンパクはstationary phase

で合成が始まり、菌の生存に必須の遺伝子であることが *M. smegmatis* を用いた研究で明らかになっている³⁾。*S. kasugaensis* の ORF3 タンパクは結核菌の mIHF タンパクと高い相同性を示し、増殖様式の変換に、ORF5 とともに重要であることが報告されている。結核菌の Rv1390 単独か、または *mIHF-gmk-Rv1390* の3つの遺伝子が関連して *M. smegmatis* の増殖を休眠状態に誘導していることが示唆され、さらに解析が必要である。

結核菌は増殖が遅く、凝集性が強く、バイオハザードの面からも実験上の制約が大きい。さらにカルタヘナ議定書の批准に伴い、組換え DNA 実験は2004年より法規制となった。結核菌を用いた組換え DNA 実験は大臣承認となり、さらに実験上の厳しい規制が生じた。ここで紹介した *M. smegmatis* J15CS と pYT 923hyg α の宿主ベクター系を用いた結核菌の *mIHF-gmk-Rv1390* 遺伝子の研

究は、結核菌の細胞内増殖性、休眠状態への移行を分子遺伝学的に研究するうえできわめて有用な系であると考えられる。

文 献

- 1) Goto Y, Taniguchi H, Udou T, et al.: Development of a new host vector system in mycobacteria. FEMS Microbiol. Letters. 1991 ; 7 (83) : 277-282.
- 2) Kojima I, Kasuga K, Kobayashi M, et al.: The *rpoZ* gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. J. Bacteriol. 2002 ; 184 (23) : 6417-6423.
- 3) Marisa L, Pedulla ML, Hatfull GF: Characterization of the *mIHF* gene of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 1998 ; 180 (20) : 5473-5477.

5. 結核菌の薬剤耐性に関する遺伝子

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 阿部千代治

1. 薬剤耐性結核の現状

1994年に世界保健機関 (WHO) は国際結核肺疾患予防連合 (IUATLD) と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べることを目的とした世界規模のプロジェクトを開始した。これまでに WHO/IUATLD から3つの報告が出された^{1)~3)}。サーベイランスの成績は、薬剤耐性は世界の至る所で起こっていることを示している。

第3報には62カ国77地域の成績が載せられている。初回治療例で主要4薬剤のいずれかに耐性の頻度が25%以上の国または地域が13地域あり、これらのうち4地域は35%以上であった (カザフスタン57.1%, ウズベキスタンのカラカルパクスタン48.1%, 中国の遼寧省42.1%, ロシアのトムスク州37.3%)。耐性頻度の高い4地域は、治療が困難な MDR-TB の頻度も10%以上であった。また初回治療例で耐性頻度の高い地域は既治療例の耐性も高頻度であった。多変量解析の結果、初回治療例の全体の耐性および MDR は再治療例の割合と正、GDP などの経済的な因子と負の関連がみられた。しかし、DOTS の遂行や HIV 感染の割合と有意の関連はみられなかった。

わが国の結核療法研究協議会は5年毎に入院時に分離された結核菌の薬剤耐性頻度を調査してきた。2002年のサーベイランスの成績が2005年5月に報告された⁴⁾。初回治療例の主要4薬剤のいずれか1剤に対する耐性の頻度は8.2%, MDR は0.7%であり、WHO/IUATLD から

報告された中央値よりいくぶん低い頻度であった。既治療例のそれらは22.8%と9.8%であり、1997年のサーベイランスの成績より大分改善がみられたが世界の中央値 (いずれか:18.4%, MDR:7.0%) と比べて高い頻度であった。これらのことは、わが国でも薬剤耐性結核は大きな問題であることを示している。

2. 薬剤耐性の分子機構

抗酸菌の薬剤耐性は自然に生ずる突然変異によるものと結論されている。これらの耐性菌は薬剤と接触前の結核菌集団に含まれており、抗結核剤による治療中に耐性菌が選択される。結核菌の薬剤耐性を支配する遺伝子はゲノム性と考えられており、一般細菌でみられる耐性プラスミド分離の報告はない。

多くの INH 耐性菌にカタラーゼ活性の減弱がみられること、高度耐性分離株では完全に消失していることが知られている。カタラーゼとパーオキシダーゼの両者をコードしている *katG* 遺伝子の欠失は結核菌の高度耐性と関連している⁵⁾。INH 耐性菌で *katG* 遺伝子内に変異の存在する株もみつかっている。これらのことは、prodrug である INH は活性化のために KatG が必要であり、KatG の変異は INH 耐性を導くことを示している。INH の標的として細胞壁ミコール酸生合性に関与する NADH-dependent enoyl ACP reductase をコードしている *inhA* が同定された⁶⁾。耐性の発現には *InhA* のアミノ酸置換または *inhA* オペロンの変異が関係している。

RFPは細菌のDNA-dependent RNA polymeraseに結合しmRNAの合成を妨害する。RFP耐性結核菌分離株の93%以上は*rpoB*遺伝子に変異を持ち、特にクラスターIに属する81 bpからなるホットスポット領域に変異が集中して認められる。一方RFP感受性株にはこの領域に変異がみられない。分離された地域により若干異なるが、約50%の耐性菌はSer-531に変異を持つ。続いてHis-526とAsp-516であり、耐性分離株の80%以上はこれら3アミノ酸の置換と関連している⁷⁾。

PZA耐性結核菌臨床分離株は通常ピラジナミダーゼ(PZase)活性を欠いており、PZA耐性と酵素活性の損失の間に相関がみられる。PZase陰性結核菌の95%以上はPZaseをコードしている*pncA*遺伝子に変異がみられる⁸⁾。変異は遺伝子全般に分布しており、RFP耐性菌にみられるようなホットスポット領域は認められない。PZase陽性株には変異がみられないことから、*pncA*の変異はPZase活性に関与していることが考えられる。

SMはアミノグリコシド抗生物質であり、30Sリボソームのサブユニットと作用し、タンパク合成に影響を与える。変異の主要な部位はリボソームタンパクS12をコードしている*rpsL*遺伝子である。SM耐性結核菌分離株では、S12タンパクのLys-43とLys-88のアミノ酸置換が頻度の高い部位である。SM耐性の第2の機構は*rrs* (16S rRNA)の変異である。SM耐性結核菌では、16S rRNAの530領域ループとループに近接する915領域に変異が集中して認められる。

EBは抗酸菌細胞壁の主要な多糖であるアラビノガラクトランの細胞壁アラビナンの重合を阻止し、アラビナン生合性の中間生成物である β -D-arabinofuranosyl-*p*-decaprenolを蓄積する。EB耐性結核菌の65%はアラビノガラクトランの重合を仲介するarabinosyl transferaseをコードしている遺伝子*embB*に変異が認められ、EmbBの変異は高レベル耐性と関連している。EmbBのコドン306領域の変異は明らかにEB耐性と関連している。

オフロキサシン耐性結核菌ではDNA gyrase Aサブユニットの構造遺伝子である*gyrA*に点突然変異がみられる。CS耐性*Mycobacterium smegmatis*ではD-alanine racemaseをコードしている*alrA*のプロモーター部に変異が認められる。KM耐性に*rrs*遺伝子、TH耐性に*inhA*遺伝子の関与が知られている。*Mycobacterium avium*や*Mycobacterium intracellulare*に有効な薬剤であるCAM耐性に23S rRNAの変異が関与していることも報告されている。

複数の薬剤に耐性を持つ臨床分離株では耐性の発現に少なくとも2つ以上の遺伝子が関与している¹⁰⁾。これまで複数の薬剤に耐性を付与する遺伝子の報告がないことから、1つの細胞で個々の薬剤に対する耐性の発現が独立して起こるものと考えられている。

3. 遺伝子を用いる薬剤感受性検査

結核菌の遺伝子変異の検出法として、ラインプローブ法、DNAチップ法、分子ビーコン法などが開発されている。一部の薬剤についてはキットによる検出も可能となった。フィノス LiPA・Rif TB (ニプロ)はラインプローブ法を採用した結核菌*rpoB*遺伝子の変異、すなわち、RFP耐性結核菌を検出する試薬である¹¹⁾。結核菌群の検出でみた感度と特異性は100%であり、RFP耐性菌の検出でみた感度と特異性は96.1%と99.6%である。RFP耐性菌の80%以上はINHにも耐性、すなわち治療困難なMDR-TBであることから、早急にRFP耐性菌を検出する意義はある。研究試薬としてOligoArray (日清紡)が開発された¹²⁾。DNAチップにより遺伝子変異を検出する方法であり、このキットで検出可能な耐性菌の割合は、INH 80%、RFP 95%、SM 80%、EB 70%、KM 70%とされている。

結核菌の薬剤感受性検査では結核菌集団に占める耐性菌の割合が1%以上の場合を耐性、1%未満の場合を感受性と判定している。しかし上記のキットではその臨界点の判定は不可能である。さらに、耐性菌の検出感度も臨床に用いるには十分とはいえない。このように現段階では、遺伝子による薬剤感受性検査を採用したとしても同時に培養法による検査も行う必要があり、今後の研究開発の進展が望まれる。

文 献

- 1) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/TB/97. 229. Geneva: WHO, 1998.
- 2) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/CDS/TB/2000. 278. Geneva: WHO, 2000.
- 3) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/HTM/TB/2004. 343. Geneva: WHO, 2004.
- 4) 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究. 平成16年度療研研究報告書, 2005.
- 5) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992; 358: 591-593.
- 6) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994; 263: 227-230.
- 7) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2663-2666.
- 8) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the

- antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Med.* 1996; 2: 662-667.
- 9) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pnca* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis.* 1998; 78: 117-122.
- 10) Morris S, Bai GH, Suffys P, et al.: Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1995; 171: 954-960.
- 11) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line probe assay によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核.* 2000; 75: 575-581.
- 12) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry.* 2000; 17: 36-44.

6. Toll-like receptor と結核感染

九州大学生体防御医学研究所発生工学分野 竹田 潔

はじめに

感染防御の中心を担う免疫系は、自然免疫系 (Innate Immunity) と獲得免疫系 (Acquired Immunity) の2種の免疫系から成り立っている。どちらの免疫系も、病原体の生体内侵入を非自己として識別し、それを排除するシステムであるが、20世紀までは獲得免疫系を中心とした非自己の認識機構が詳細に解析されてきた。獲得免疫系では、脊椎動物にのみ存在するB細胞やT細胞がそれぞれ免疫グロブリン (Immunoglobulin), T細胞受容体により、樹状細胞などの抗原提示細胞によって提示されたペプチド由来の抗原 (antigen) を非自己として認識する。これに対し、自然免疫系が認識する非自己は外界の異物そのものであり、例えばグラム陰性菌の細胞壁の構成成分のリポポリサッカライド (LPS) のように病原体の構成成分によりマクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞が活性化される。しかしながら、自然免疫系による病原体の認識機構は、獲得免疫系における抗原認識機構のように理解されていなかった。20世紀の終わりに Toll-like receptor (TLR) が発見され、その機能解析から、TLRが自然免疫系における非自己の認識受容体であることが明らかになった。そしてTLRを介した自然免疫系の活性化機構が急速に明らかになった。

自然免疫系の活性化機構

1996年に獲得免疫系の存在しないショウジョウバエのToll受容体の変異体の解析から、Tollを介したシグナルが真菌感染防御に必須の役割を果たすことが明らかになった¹⁾。続いて、哺乳類のTollホモログが1997年に初めて同定され、このシグナルが種々の炎症に関与した遺伝子を誘導することが示された²⁾。その後、ファミリー分子がToll-like receptor (TLR) として次々と発見され、現在までに11種 (TLR1-TLR11) が論文に報告されている。そしてTLRファミリーが、病原体の構成成分を特異的に認識することが、おもにノックアウトマウスを用いた解析から明らかになってきた (Fig. 1)³⁾。

TLRが病原体を認識すると、自然免疫系に属する樹状細胞やマクロファージは種々の遺伝子発現を誘導する。その中には、IL-12などの炎症性サイトカイン、CD40などの副刺激分子の遺伝子が含まれる。樹状細胞やマクロファージは従来病原体を貪食する細胞として知られていた。これらのことから、自然免疫系の細胞は、貪食による病原体由来の抗原のナイーブT細胞への提示、そしてTLRを介した炎症性サイトカインや副刺激分子の遺伝子発現により、抗原特異的な獲得免疫系、特にTh1細胞分化を誘導することが明らかになった (Fig. 2)⁴⁾。このように、TLRによる自然免疫系の活性化が、感染防御応

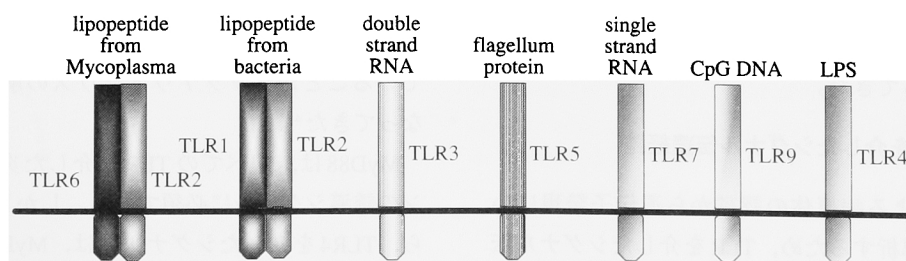


Fig. 1 Activation of innate immunity through TLR

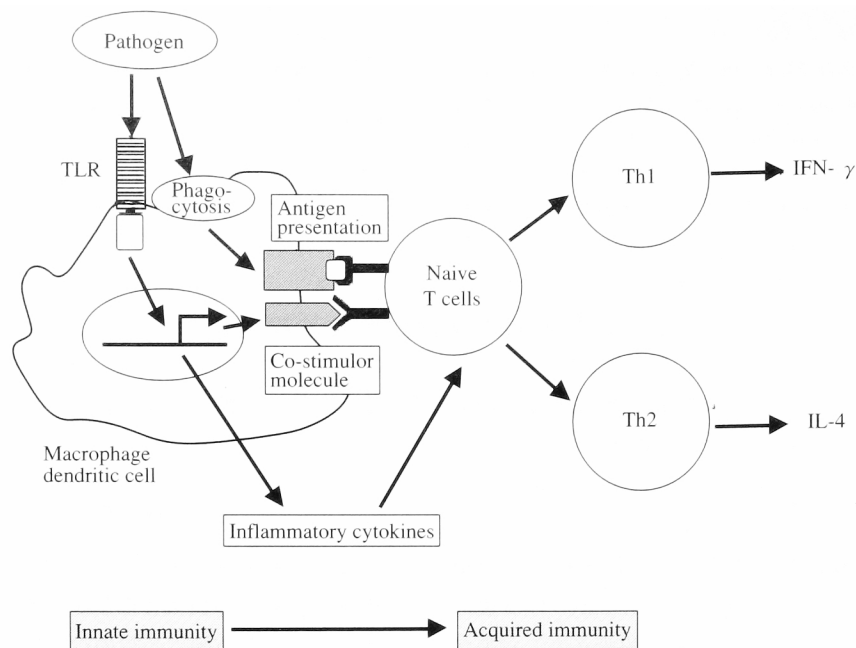


Fig. 2 Innate immunity system and Acquired immunity system

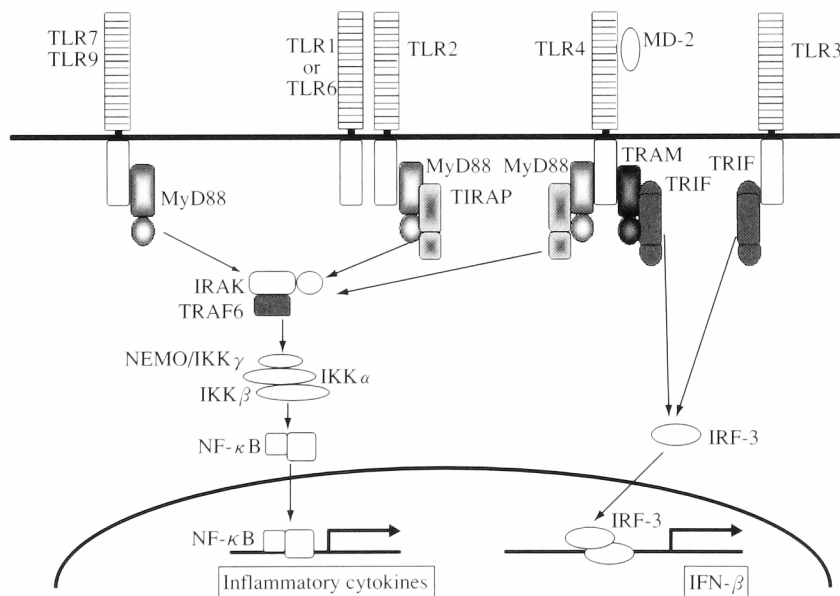


Fig. 3 Pathway of signal transduction through TLR

答のトリガーとしてきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

TLRを介したシグナル伝達経路

そこでTLRによる病原体の認識から遺伝子発現にいたる分子機構を解析するため、TLRを介したシグナル伝達経路を解析した。TLRを介したシグナルは、すべて各TLRの細胞質内に保存されたTIRドメインから開始される。その下流でも、同じTIRドメインを持った分子群

(MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM)が重要な役割を担っていることがノックアウトマウスの解析から明らかになってきた⁴⁾。

MyD88は、すべてのTLRを介した炎症性サイトカインの誘導シグナルに必須である。しかしその後の解析から、TLR4を介したシグナルには、MyD88依存性の炎症性サイトカインの産生に必須のシグナルと、MyD88非依存性のシグナルが存在し、このシグナルではIFN- β およびIFN誘導性遺伝子が転写因子IRF3の活性化を通

して誘導されることが明らかになった。また、TLR3を介したシグナルでも、MyD88非依存性にIRF3の活性化が誘導され、IFN- β が産生される。TRIFは、TLR3、TLR4を介したMyD88非依存性の経路に必須の役割を果たす。TIRAPは、TLR2とTLR4によるMyD88を介したシグナルに特異的に関与している。TRAMはMyD88非依存性 (TRIF依存性) 経路の中で、TLR4を介したシグナルに特異的に関与している。このように、TIRドメインを有する分子群が、TLRを介した細胞内シグナル伝達経路において極めて重要な役割を担っていることが明らかになった (Fig. 3)。

TLRを介したシグナルの結核感染防御における役割

このような中で、TLRによる自然免疫系活性化の、生体レベルでの結核感染防御における役割について現在解析している。これまでに、MyD88欠損マウスで、結核菌やBCGの感染に対し感受性がやや高まることが報告されている。私たちは、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスではBCG感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF二重欠損マウスの肺では、多数の壊死性病変が観察された。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。BCG感染においては、Th1応答が感染

防御に重要な役割を担っている。MyD88欠損マウスでは、BCG感染後のTh1応答が正常と比べて3分の1程度に低下するが、MyD88/TRIF二重欠損マウスでもTh1応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLRを介した自然免疫シグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

ま と め

以上、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御に関わっていることが明らかになってきた。しかし、TLR非依存性のTh1誘導機構も結核感染ではあることが示され、今後の解析の進展が待たれる。

文 献

- 1) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973-983.
- 2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
- 3) Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 335-376.
- 4) Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.

———— The 80th Annual Meeting Symposium ————

FRONTIER OF MYCOBACTERIUM RESEARCH
—— Host vs. Mycobacterium ——

Chairpersons: ¹Masaji OKADA and ²Taro SHIRAKAWA

Abstract During the past decade, we have observed advance in tuberculosis research including novel vaccines, innate immunity (TLR), SNP analysis and molecular mechanism of drug resistance. Worldwide genome project enabled the whole genome sequence of host resistant against tuberculosis as well as the whole genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. DNA technology has also provided a great impact on the development of novel vaccine against TB.

In this symposium, we have invited leading researchers in the field of the frontier study of Mycobacterium research in order to provide general overview of the cutting edge of frontier research.

Molecular mechanism of drug resistance of *M. tuberculosis* has been clarified. On the other hand, molecular mechanism of host-defence (insusceptibility of host) against *M. tuberculosis* has not yet elucidated. Dr. Taro Shirakawa (Kyoto University) reviewed the susceptibility genes of host in TB infection and presented candidate genes associated with multi-drug resistant tuberculosis. Dr. Naoto Keicho (International Medical Center of Japan) tried to identify host genetic factors involved in susceptibility to pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach.

In Japan, Dr. Masaji Okada (National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center) has been engaged actively in the development of new tuberculosis vaccines (HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine). He showed basic strategy for construction of new candidate vaccines and also showed significant efficacy on the protection of tuberculosis infection using cynomolgus monkeys, which are very similar to human tuberculosis.

Dr. Hatsumi Taniguchi (University of Occupational and Environmental Health) presented that *M. tuberculosis mHf* and the neighbor genes went into a dormancy-like state of *M. smegmatis* in J774 macrophage cells. This study might provide a weapon for elucidating the mechanism of dormancy of *M. tuberculosis* and the development of novel therapy.

Dr. Chiyoji Abe (Nippon Becton Dickinson Co.) reviewed the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements.

Dr. Kiyoshi Takeda (Kyushu University) showed interesting finding. He analyzed whether Toll-like receptor (TLR) – mediated activation of innate immunity in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice showed high sensitivity to mycobacterial infection,

indicating that innate immunity is involved in anti-mycobacterial infection.

1. SNP (single nucleotide polymorphism) analysis in association with *Mycobacterium tuberculosis*: Taro SHIRAKAWA (Department of Health Promotion & Human Behavior, Kyoto University Medical School, and RIKEN SRC Center)

Candidate gene approach was made on 18 SNPs in 11 genes in association with *M. tuberculosis*. Patients with multi-drug resistance against *M. tuberculosis* are also subjected. SNPs in *NRAMP1* gene were associated with the disease, and drug resistance, its mechanisms remain unknown.

2. Search for genes susceptible to pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: Naoto KEICHO (Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan)

Interaction among pathogens and host factors is important for development of infectious diseases. We are trying to identify host genetic factors involved in susceptibility to non-immunocompromized pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach. Elucidation of functional significance of susceptibility gene polymorphisms will lead to a new strategy for control and prevention of the disease.

3. T cell immunity against Tuberculosis in host and the establishment of novel vaccine: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center)

T cell (CTL, Th1) immunity including granulysin play an important role in host defense against tuberculosis (TB) in human. Patients with TB or Multi-drug resistant TB showed suppression of all these immunities.

HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccination was 100 fold more efficient than BCG on the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) in the BALB/c mice. Cytotoxic T cells activity against M.TB was augmented. By using these new vaccines (Hsp 65 DNA + IL-12 DNA, recombinant 72f BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines was observed. Thus, these novel vaccines should provide a useful tool for the prevention of human TB infection.

4. *Mycobacterium tuberculosis mHf* and the neighbor genes go into a dormancy-like state of *M. smegmatis* J15CS in J774

cells: Hatsumi TANIGUCHI (Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health)

Mycobacterium smegmatis J15CS transformants harboring the *mIHF* gene or the *mIHF-gmk-Rv1390* genes showed no difference in *in vitro* growth and acid-fastness. However, transformants harboring *mIHF-gmk-Rv1390* formed short-rod cell morphology and decreased acid-fastness in the mouse macrophage-like cell line J774 compared to those of the other transformants, and the nuclei of the infected J774 cells also changed. Nevertheless, the colony forming units were similar.

These indicate that *mIHF* and the neighbor genes of *M. tuberculosis* might regulate a growth of mycobacteria in macrophages.

5. Molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs: Chiyoji ABE (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)

Considerable progress has been made toward understanding the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related usually to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements. Multi-drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* arise a consequence of sequential accumulation of mutation conferring resistance to single therapeutic agents. The basis of resistance is not able to be explained yet in a substantial percentage of strains for other anti-tuberculosis drugs than rifampin and pyrazinamide. Further studies are required to fully understand the molecular mechanisms of resistance.

6. Toll-like receptors in anti-mycobacterial immune responses:

Kiyoshi TAKEDA (Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Toll-like receptors (TLRs) play an essential role in the recognition of specific patterns of microbial components. TLRs mediate activation of innate immunity and further development of antigen-specific adaptive immunity. In TLR signaling pathways, Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptors, such as MyD88, TIRAP, TRIF, and TRAM, have been shown to play pivotal roles. Thus, the molecular mechanisms for TLR-mediated activation of innate immunity have been largely understood. We analyzed whether TLR-mediated activation of innate immunity is involved in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice, in which TLR-dependent activation of innate immunity is abolished, showed high sensitivity to mycobacterial infection, indicating that innate immunity is critically involved in anti-mycobacterial responses.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Frontier study

¹General Director, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, ²Kyoto University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)