

令和元年6月26日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05187

研究課題名(和文)結核の潜在化機構の解析と、潜在化の維持による結核制圧戦略の構築

研究課題名(英文) Study of tuberculosis latency and development of anti-tuberculosis strategy by keeping latent state

研究代表者

松本 壮吉 (Matsumoto, Sohkiichi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30244073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：結核は、年間150万人が死亡する最大級の細菌感染症である。結核菌のすみかはヒトであり、感染者(潜在性結核)の5-10%で、菌の再増殖が生じ結核が発症する。したがって潜在性結核に対処し発症を抑止することが疾患の制圧につながる。潜在期において結核菌は、増殖を停止した休眠(dormant)状態にある。本研究は、結核菌の休眠を誘導する分子の解析を基軸として、潜在化の機構解明と、発症抑止による新しい結核制御法の構築を指向した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌は無限増殖細胞であるがゆえに、その長生きについての研究は少ない。一方で、抗酸菌は分裂を停止して休眠し長期間生存する。この特徴は、抗酸菌症の経過を特徴づけている。抗酸菌の長寿の機構を、特徴的な休眠の鍵分子を足がかりとして解析した結果、霊長類の長寿とも共有するメカニズム、すなわち増殖抑制、低代謝、ラジカル抵抗性、の重要性を明かにした。本研究は、細菌から霊長類まで、真核生物に普遍的な長期生存のメカニズムが、細菌細胞でも共有されることを示した。本成果は、我々の長寿のヒントも啓示し、また難治性抗酸菌症の発生源である無症候感染の縮小を図る革新的な制御法開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)： Tuberculosis is a serious health threat that kills more than 1.5 million people annually. Mycobacterium tuberculosis, an etiologic agent of tuberculosis, persistently infects one third of the human population, and 5 to 10% of them develops tuberculosis. Accordingly, prevention of the progression from latent tuberculosis is an efficient for tuberculosis control. At the latent stage M. tuberculosis is under dormant state where growth has ceased. Here we showed importance of suppression of energy production and fatty acid synthesis of mycobacteria for long term survival of mycobacterial after entering stationary phases. Our data provided reasonable basis of establishing a new control strategy against tuberculosis by deterring the disease onset.

研究分野：細菌学

キーワード：結核 ハンセン病 非結核性抗酸菌症 潜在性結核 LTBI 天然変性蛋白質 ヒストン様蛋白質

1. 研究開始当初の背景

結核(症)は、年間150万人の死を招来する最大級の感染症である。感染成立後、速やかに発症するのは5%程で、殆どの感染者において無症候感染が成立する。現在、人類の1/3~4(約18億人)が無症候感染と推測されており、その5-10%が、潜伏菌の再増殖、すなわち内因性再燃により結核を発症する。従って、無症候感染は、将来に結核を発症する可能性があることから潜在性結核(LTBI)と呼ばれる。

潜在性結核の成立後、宿主応答のみでは菌を生体から駆逐できない。このような結核菌の宿主防御系に対する極めて高い抵抗性が、寄生や病原性の要である。しかし結核菌は、発症なしに子孫を残すことができない。なぜなら、菌は空気感染でのみ伝播し、自然環境下では生存できず、感染宿主の死は、感染結核菌の死滅をもたらすからだ。実際に感染者は、未発症であれば感染源とならない。このような事実から申請者は、『発症を抑止し、結核の潜在化を維持することで結核を制圧できる』と提唱する。潜在期において感染結核菌は、分裂しないが、長期間生存し薬剤抵抗性となる休眠形状態で潜伏していることが知られる。申請者は休眠抗酸菌に顕著に発現する増殖抑制性蛋白質MDP1を見いだした。現在、感染者の検出やワクチン開発にむけてMDP1の応用が進められている。本研究は、これまでの研究を継続・発展させ、組み換え抗酸菌技術を利用して、潜在化の機構解明を目指すと共に、発症傾向の検出技術や発症抑止による新しい結核制御法の構築を指向した。

2. 研究の目的

結核の発症母体は、潜在化した無症候感染であり、18億の人類に休眠している潜伏感染結核菌である。休眠潜伏菌は、増殖を停止しながらも、人の寿命を越えて生き続けることができる。申請者は、増殖抑制能を有し、抗酸菌の静止期以降に発現が亢進する分子MDP1を同定した。本研究は、MDP1を基軸に、結核菌の長期生存メカニズムの解明と発症抑止による新しい結核の制圧戦略の構築を目的とした。

未発症の結核菌感染者においてMDP1が顕著に発現していることが確認されている。免疫応答は、病原体量に相関することから、MDP1に対する宿主応答を利用した感染や発症の予測診断法開発が進められている。また、MDP1と免疫賦活DNAを混合して免疫することで防御免疫が誘導できることから、MDP1と核酸アジュバントを混合した成分ワクチン開発が進められている。

一方で基礎研究や応用研究の進行に伴い、解明・解決すべき新たな課題が生じている。課題の一つは、宿主応答の検出や誘導において、蛋白質の構造に関する考慮が不十分であること、またMDP1は再燃や発症時には結核菌からの産生が減少することから、MDP1の低下により発現が誘導される発症期の結核防御抗原を、ワクチン成分として補填すべきということである。

またMDP1のC末領域は、特徴的な塩基性アミノ酸の繰り返しからなることが分かっていたが、興味深いことに昨今、本領域が一定の立体構造を有さない『天然変性領域』であることが分かった。天然変性領域は、細菌で希である。この抗酸菌に特有の変性領域が、MDP1の活性にどのように関わるか未解明である。

3. 研究の方法、下記の4項目を実施した。

- ・MDP1欠失抗酸菌の表現型解析
- ・天然変性領域欠失MDP1を産生する組み換え抗酸菌の作成とその表現型解析
- ・MDP1発現抑制誘導組み換え結核菌の作成と表現型解析
- ・感染や発症を検出する診断法開発
- ・ワクチンの効果試験

4. 研究成果

- ・MDP1欠失抗酸菌の表現型解析

MDP1欠失 *M. smegmatis* は、野生株に比べ、静止期以降に生菌数の減少が著しいことが分かった。その時の欠失株と野生株の蛋白質発現パターンを、二次元電気泳動により

比較した。結果 3 倍量以上発現が亢進する 28 スポットを欠失株に認めた。それらを質量分析によって同定した結果、DnaA、NDH、FasI、KatG など、それぞれ、複製、NADH の酸化、脂肪酸合成、レドックスと結核薬イソニアジドの活性化に関わる分子が含まれていた。生化学的検討により、静止期において実際に MDP1 欠失菌は、複製や代謝、およびラジカルやイソニアジド感受性が亢進することが分かった。真核生物に共通する長寿の機構として、増殖や代謝の抑制、およびラジカル抵抗性があるが、MDP1 の活性と重なることが判明し、細菌と真核生物で長寿の機構が共有されることが分かった (Enany et al. Sci Rep. 2017)

・天然変性領域欠失 MDP1 を産生する組み換え抗酸菌の作成とその表現型解析

MDP1 の特徴の一つは、抗酸菌特異的な C 末領域の繰り返し構造だが、これにより MDP1 が細菌ではまれな天然変性蛋白質であることが分かった (Ohara Y et al., PLOS ONE, 2018)。天然変性領域を欠失させた MDP1 を発現する *M. smegmatis* を作成し、その表現型解析を行った。その結果、MDP1 による増殖と複製の抑制、ゲノム濃縮、薬剤抵抗性誘導は、天然変性領域に依存することが判明した (Savitskaya A et al., Sci Rep. 2018)

・MDP1 発現抑制誘導組み換え結核菌の作成と表現型解析

結核菌での MDP1 の役割や、MDP1 が制御する遺伝子を特定することを計画した。化合物の添加によって MDP1 の産生が抑制される組み換え結核菌を作成した。MDP1 の発現消失をウエスタンブロットにて確認した後に、RNA を採取して、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。最も転写量が減少していたのは、想定通り MDP1 であった。リード数解析により、MDP1 が抑制する遺伝子群と、MDP1 依存的に転写が亢進し、休眠期に発現するとおもわれる分子を特定した。

・感染・発症を検出する診断法開発。

増殖期に産生される結核菌抗原に比し、MDP1 に対する抗体は、未発症の結核菌感染者でよく検出されることが分かっている。特に発症リスクの高い、陈旧性結核や Recent LTBI で抗体価が高い傾向があり、結核の発症予測診断への応用が期待される。MDP1 の立体構造に注目し、N 末のヒストン様蛋白質領域の構造を維持することが、無症候感染者の抗体による検出に有効であることを示した (Ohara Y et al. PLOS ONE, 2018)。また、MDP1, ESAT6, CFP10, Ag85, Acr 等の複数の主要結核菌抗原に対して、病院検診にて高い抗体価を有すると判断された健常者が、その後結核を発症したことが分かり、発症予測診断への利用可能性を示した (Maekura R et al., Microbiol Immunol)

・免疫原性の検討とワクチン効果の試験

結核ワクチン BCG の問題点は、生ワクチンである BCG が接種宿主に長くとどまるにも関わらず、効果が減衰することにある。したがって幼少期に接種した BCG の効果が成人期に低下する。BCG の効果を成人期に再活性化し、発症を抑制するブースターワクチンへの応用を検証した。MDP1 の制御を逃れ、増殖期に産生される Ag 85 や ESAT6 等と休眠期に産生される抗原を調整し、BCG 接種者由来の末梢血単核球に対する刺激性を検証し、抗原性を確認した。またモルモットや霊長類 (カニクイザル) を用いて、ワクチン効果を検証し、ブースターワクチンによって生体内結核菌の増殖が有意に抑えられることを示した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Osada-Oka, M., N. Goda, H. Saiga, M. Yamamoto, K. Takeda, Y. Ozeki, T. Yamaguchi, T. Soga, Y. Tateishi, K. Miura, D. Okuzaki, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2019. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for *Mycobacterium tuberculosis* infection. International Immunology In press.
2. Maekura, R., S. Kitada, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Fujicawa, M. Miki, O. Jyunko, M. Mori, and S. Matsumoto. 2019. Serum antibody profiles in individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbiol Immunol 63: 130-138.
3. Savitskaya, A., A. Nishiyama, T. Yamaguchi, Y. Tateishi, Y. Ozeki, M. Nameta, T. Kon, S. A. Kaboso, N. Ohara, O. V. Peryanova, and S. Matsumoto. 2018. C-terminal intrinsically disordered region-dependent organization of the mycobacterial genome by a histone-like protein. Sci Rep 8:

4. Ohara, Y., Y. Ozeki, Y. Tateishi, T. Mashima, F. Arisaka, Y. Tsunaka, Y. Fujiwara, A. Nishiyama, Y. Yoshida, K. Kitadokoro, H. Kobayashi, Y. Kaneko, I. Nakagawa, R. Maekura, S. Yamamoto, M. Katahira, and S. Matsumoto. 2018. Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis. *PLoS One* 13: e0204160.
5. Niki, M., T. Yoshiyama, Y. Miyamoto, M. Okumura, M. Niki, K.-i. Oinuma, Y. Kaneko, S. Matsumoto, Y. Sasaki, H. Ogata, H. Goto, S. Kudoh, and Y. Hoshino. 2018. Longitudinal Evaluation of Humoral Immunity and Bacterial and Clinical Parameters Reveals That Antigen-Specific Antibodies Suppress Inflammatory Responses in Active Tuberculosis Patients. *Journal of Immunology Research* 2018: 1-11.
6. Inoue, M., M. Niki, Y. Ozeki, S. Nagi, E. A. Chadeka, T. Yamaguchi, M. Osada-Oka, K. Ono, T. Oda, F. Mwendu, Y. Kaneko, M. Matsumoto, S. Kaneko, Y. Ichinose, S. M. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2018. High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor alpha production by mycobacteria-infected human macrophages. *Sci Rep* 8: 6736.
7. Enany, S., Y. Yoshida, Y. Tateishi, Y. Ozeki, A. Nishiyama, A. Savitskaya, T. Yamaguchi, Y. Ohara, T. Yamamoto, M. Ato, and S. Matsumoto. 2017. Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of *Mycobacterium smegmatis* and simultaneously coordinates cellular functions. *Sci Rep* 7: 6810.

[学会発表](計 23 件)

1. Long term survival and organization of the genome by the intrinsically disordered histone-like protein in mycobacteria and its application to the diagnosis of asymptomatic tuberculosis, □頭, Anna Savitskaya, Shymaa Enany, Yukiko Ohara, Akihito Nishiyama, Yuriko Ozeki, Takehiro Yamaguchi, Tsukasa Mashima, Yoshitaka Tateishi, Masaaki Nameta, Yutaka Yoshida, Shaban A. Kaboso, Haruka Kobayashi, Manabu Ato, Seigo Kitada, Ryoji Maekura, Olga V. Peryanova, Masato Katahira, and Sohkichi Matsumoto, □頭, 日米医学協力計画 抗酸菌症部会, 2019/2/18-3/1, ベトナム ハノイ
2. Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of *Mycobacterium smegmatis* and simultaneously coordinates cellular functions. Shymaa Enany, Yutaka Yoshida, Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Akihito Nishiyama, Anna Savitskaya, Takehiro Yamaguchi, Yukiko Ohara, Tadashi Yamamoto, Manabu Ato, and Sohkichi Matsumoto, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
3. Antibody responses from tuberculosis patients in Surabaya, Indonesia against *Mycobacterium tuberculosis* protein. Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi, Ni Made Mertaniasih, Soedarsono⁴, Yuriko Ozeki, and Sohkichi Matsumoto. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
4. The role of HIF-1 α -regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. Mayuko Osada-Oka, Mutsumi Sato, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16, Niigata, Japan
5. Whole-Genome Sequencing Analysis of Genotype Specific in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Osaka Prefecture, Aki Tamaru, Takayuki Wada, Sohkichi Matsumoto, Tomotada Iwamoto. Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
6. A new screen for tuberculosis drug candidates utilizing a luciferase-expressing recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Yuriko Ozeki, Masayuki Igarashi, Matsumi Doe, Aki Tamaru, Naoko Kinoshita, Yoshitoshi Ogura, Tomotada Iwamoto, Ryuichi Sawa, Maya Umekita, Shymaa Enany, Yukiko Nishiuchi, Mayuko Osada-Oka, Tetsuya Hayashi, Mamiko Niki¹, Yoshitaka Tateishi, Masaki Hatano, and Sohkichi Matsumoto. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
7. The effects of booster vaccine composed of MDP1 and G9.1 against tuberculosis in cynomolgus monkeys. Daisuke Hayashi, Jun-ichi Maeyama, Toshiko Yamamoto, Toshio Yamazaki, Tetsu Mukai, Toshiki Tamura, Sachi Okabayashi, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Akira Yokoyama, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Yoshitaka Goto, Sumiko Iho, Sohkichi Matsumoto and Saburo Yamamoto. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
8. Serum antibody profiles in individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. (LTBI) Takeya Fujikawa, Ryoji Maekura, Seigo Kitada, Mayuko Osada-Oka, Yoshitaka Tateishi, Junko Ogawa², Masahide Mori and Sohkichi Matsumoto. US-Japan

- Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
9. 結核の潜在化のメカニズムと IGRA などの結核菌感染診断について, 口頭, 松本 壮吉, 第 132 回日本結核病学会東海地方会, 2018 年 11 月 18 日, 静岡県浜松市 浜北文化センター
 10. Development of control strategies against tuberculosis based on molecular mechanism of persistence of *Mycobacterium tuberculosis* and host immune responses to it, 松本 壮吉, 10TH NATIONAL CONGRESS OF INDONESIAN SOCIETY FOR CLINICAL MICROBIOLOGY, 2018/10/12-14, インドネシア東ジャワ州スラバヤ アイルランガ大学
 11. 結核の免疫, 口頭, 松本 壮吉, 第 93 回日本結核病学会総会, 2018/6/23-24, 大阪府大阪市 大阪府立国際会議場
 12. 抗酸菌ヒストン様タンパク質による染色体制御における天然変性領域の役割, 西山 晃史, Anna Savitskaya, 山口 雄大, 大原 直也, 尾関 百合子, 立石 義隆, 松本 壮吉, 第 55 回日本細菌学会中部支部総会, 2018/10/12-13, 石川県金沢市 金沢医科大学
 13. 結核菌に対する新規抗菌薬 Lysocin E の抗菌作用, 口頭, 稲泉 茜, 山口 雄大, 尾関 百合子, 西山 晃史, 浜本 洋, 関水 和久, 松本 壮吉, 第 55 回日本細菌学会中部支部総会, 2018/10/12-13, 石川県金沢市 金沢医科大学
 14. 潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用, 大原 由貴子, 尾関 百合子, 立石 義隆, 真嶋 司, 有坂 文雄, 津中 康央, 藤江 芳江, 西山 晃史, 吉田 豊, 北所 健悟, 小林 悠, 金子 幸弘, 中川 一路, 前倉 亮治, 山本 三郎, 片平 正人, 松本 壮吉, 第 55 回日本細菌学会中部支部総会, 2018/10/12-13, 石川県金沢市 金沢医科大学
 15. 血清診断法開発を目指した、非結核性抗酸菌症の新規抗原の探索, 口頭, 薄田 佑衣, 立石 義隆, 北田 清吾, 前倉 亮治, 阿戸 学, 西山 晃史, 尾関 百合子, 松本 壮吉, 第 55 回日本細菌学会中部支部総会, 2018/10/12-13, 石川県金沢市 金沢医科大学
 16. 結核の潜在化のメカニズムと IGRA などの結核菌感染診断について, 松本 壮吉, 口頭, 第 132 回日本結核病学会東海地方会, 2018/11/17-18 日, 静岡県浜松市 浜北文化センター
 17. Anna G. Savitskaya, 西山晃史, 大原直也, 松本壮吉. 抗酸菌における誘導発現系を用いた Mycobacterial DNA-binding protein 1 の機能解析第 90 回日本細菌学会総会。仙台、2017 年 3 月 19 日~21 日(国内)
 18. 西山 晃史, Shymaa Enany, 立石 善隆、尾関 百合子、Anna G. Savitskaya¹、山口雄大、西田由貴子、阿戸学、松本 壮吉。抗酸菌の長期の生存に必須な細胞機能のヒストン様タンパク質依存的な制御第 90 回日本細菌学会総会。仙台、2017 年 3 月 19 日~21 日(国内)
 19. From biology of *Mycobacterium* to the development of the control strategies against tuberculosis, Sohkichi Matsumoto. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 2017 年 5 月 18 日, Nagasaki, Japan
 20. 西山 晃史, Anna Savitskaya, 松本 壮吉, 第 10 回細菌学若手コロッセウム(草津) ヒストン様 DNA 結合タンパク質による結核菌の増殖抑制作用、平成 28 年 7 月 31 日-8 月 2 日(国内)
 21. Study of a novel CpG oligodeoxynucleotide to promote vaccine ability against TB or Flu. Jun-ichi Maeyama, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Hideki Asanuma¹, Matsumoto Sohkichi, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, 2017 ISV Annual Congress, 2017/10/5-7, Paris, France.
 22. 松本 壮吉、結核・抗酸菌に特徴的な薬剤標的と新規薬剤の開発研究、第 65 回日本感染症学会東日本地方会(新潟) 2016 年 10 月 26-28 日(国内)
 23. Anna Savitskaya, Akihiko Nishiyama, and Sohkichi Matsumoto, Morphologic analysis of the functions of the mycobacterial protein, 第 53 回 日本細菌学会中部支部会、(新潟) 2016 年 10 月 28-29 日(国内)

〔図書〕(計 2 件)

1. 松本 壮吉。シンプル微生物学、小熊 恵二、堀田 博、若宮 伸隆 編。マイコバクテリアウム属、南江堂、東京、196-203、2018
2. 松本 壮吉。結核の潜在化と発症機構。結核。光山 正雄、鈴木 克洋 編。医薬ジャーナル社、大阪、134-149、2017。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：免疫原性を有する MDP1 の製造方法
発明者：尾関 百合子、西山 晃史、大原 直也、山本 三郎、松本 壮吉。
権利者：国立大学法人新潟大学、国立大学法人岡山大学
種類：特許
番号：特願 2018-107292
出願年：2018
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：免疫刺激 G9.1 の抗結核ブースターワクチン創出への応用
発明者：伊保 澄子、前山 順一、松本 壮吉、山本 三郎
権利者：国立大学法人福井大学 国立感染症研究所 公立大学法人大阪市立大学 日本ビ
ーシージー製造株式会社
種類：特許
番号：5906019 号
取得年：2017
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med-niigatauniv-bacteriol.org>
6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：阿戸 学
ローマ字氏名：Manabu Ato
所属研究機関名：国立感染症研究所
部局名：ハンセン病センター
職名：部長
研究者番号（8桁）：20392318

研究分担者氏名：田村 敏生
ローマ字氏名：Toshiki Tamura
所属研究機関名：国立感染症研究所
部局名：ハンセン病センター
職名：室長
研究者番号（8桁）：40291306

研究分担者氏名：西山 晃史
ローマ字氏名：Akihito Nishiyama
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学系
職名：講師
研究者番号（8桁）：80452069

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前倉 亮治
ローマ字氏名：Ryoji Mekura

研究協力者氏名：尾関 百合子
ローマ字氏名：Yuriko Ozeki

研究協力者氏名：片平 正人
ローマ字氏名：Masato Katahira

研究協力者氏名：山口 雄大
ローマ字氏名：Takehiro Yamaguchi