

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26305017

研究課題名(和文) 潜在性結核の検出と、結核の発症予知技術の確立を目指した、ケニア国における調査研究

研究課題名(英文) The research in Kenya for the development a diagnostic method of asymptomatic M tuberculosis infection and disease progression

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)： 活動性結核の源泉となる無症候感染のリメカニズムや、無症候感染からの発症予知技術の開発を目的として、結核高蔓延地区であるケニア共和国において研究を実施した。その結果、結核患者(発症者)で応答の高い抗原と、無症候感染で検出される抗原応答性を組み合わせて、無症候の結核菌感染者を検出したり、結核菌感染後の発症を予知できる可能性が示された。またケニア結核菌感染者にHDLコレステロール値が高いことをみだし、その背景となるメカニズムを解析した結果、HDLはマクロファージが結核菌感染によって産生する宿主防御的なサイトカインTNF-alphaをTLR2の発現抑制によって抑制することが分かった。

研究成果の概要(英文)： This study was performed in tuberculosis-endemic area in Kenya to address molecular mechanisms of latency and know the fundamental knowledge for prediction of disease progression. We found some M. tuberculosis antigens are well recognized by host immune response, while some other antigens were done in individuals with asymptomatic infection. This suggested that detection of the immune responses to M. tuberculosis antigens can be applied for diagnosis of asymptomatic infection and disease progression.

We also found elevated HDL-cholesterol levels in M. tuberculosis-infected individuals. We found human macrophages produces TNF-alpha, a host protective cytokine against tuberculosis, depending on TLR2 upon M. tuberculosis infection. And HDL suppresses TLR2 expression and its cellular signaling. These suggest that higher HDL level may be risk of both asymptomatic and active tuberculosis.

研究分野：細菌学

キーワード：結核 感染 マクロファージ ケニア 寄生虫 コレステロール HDL

1. 研究開始当初の背景

結核(症)は、グラム陽性細菌である結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症で、AIDS (HIV 感染症) やマラリア (マラリア原虫感染症) と並ぶ三大感染症の一つであり、2013 年当時、年間 140 万人の命を奪っていた(2017 年現在は、170 万人の命を奪った)。

結核菌は、飛沫核感染によって、肺を侵入門戸として人に感染する。感染者の一部は、速やかに結核を発症するが、感染者の 95% 以上で無症候感染が成立する。現在、人類の 1/3 が無症候感染者であると推定されており、その 5-10% が、感染菌の再増殖 (再燃) により結核を発症する。このように無症候感染は、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」とも呼ばれる。

一方で結核菌はヒト体内での生存力に旺盛であるが、他の生体や自然環境下での生存能に劣る。このような背景から研究申請者は、ヒトに感染している結核菌を対処することにより、結核の制圧が可能と考えている。それには、活動性結核(発症)に加え、病原体の源泉である潜在性結核に対処する必要があると考える。

2. 研究の目的

活動性結核の源泉となる無症候感染の成立自体のリスクが不明である。また無症候感染を IGRA (主に結核菌抗原 ESAT6 と CFP10 に対する T 細胞の IFN-gamma 産生応答試験) で判定するが、IGRA 陽性の健常者は、本邦で少ない。一方で、結核の高度蔓延地区であるアフリカや東南アジア諸国では、多数の無症候感染者がみこまれる。

一方で結核菌感染の検出にも改善の余地がある。IGRA の結核患者の陽性率は 80% 程度で、潜在性結核にいたっては 50% 程と、十分な感度とはいえない。また T 細胞応答で検出するため細胞培養や検出装置が必要で、とくに結核の蔓延する途上国では実施できないことが多い。

そのような中で申請者等は、ケニア共和国 Mbita 地区で、無症候の結核菌感染者のサーベイを行い、寄生虫感染や栄養成分と結核菌感染の相関をみいだした。また昨今、high-density lipoprotein (HDL) コレステロール値が、結核菌感染者で高いことも発見していた。

本研究は、ケニア共和国での研究を継続し、無症候感染者と発症者の異なる免疫応答の解析に付随して、無症候感染の検出法や発症予知法の提案や、HDL が結核菌感染のリスクとなる分子メカニズム解明を目的として実施した。

3. 研究の方法

ESAT6, CFP10, Antigen 85, Acr, MDP1, HBHA 等の結核菌蛋白質の遺伝子を、結核菌ゲノムを鋳型として PCR でクローニングし、pET32 発現ベクターに挿入してチオレドキシシタグ付加蛋白質として大腸菌で発現させた。精製はニッケルカラムを用いて行い、LPS の除去が不十分である場合は、イオン交換カラムと組み合わせてカラムワークを複数回行い、LPS 不含の結核菌抗原を調整した。また一部の抗原は、アミノ酸配列を元にオーバーラップペプチドを合成して T 細胞刺激に利用した。作成した結核菌抗原の抗体検出では ELISA に加え、マルチプレックスによるビーズアレイで検証した。

検体は、ケニア共和国 Busia, Mbita, Kuwale 地区において、各病院に来院する結核患者や一般住民から、また対照として健常者やマラリア患者から生体試料を採取して用いた。いずれもインフォームドコンセントを得た後に、生体試料の採取を行った。

寄生虫感染の診断には、尿や便を採取し、尿濾過法や Kato-Katz 法により糞便中の虫卵を検鏡し、各種寄生虫感染の有無を特定した。結核菌の感染は、抹消血単核球 PBMC を分離した後に、IGRA に準じて ESAT6 と CFP10 とを添加し、37 度にて炭酸ガス培養器にて一日培養した後に上清を採取し、産生された IFN-gamma をイミュノクロマト法で検出した。

HDL と LDL を、ヒト血液より密度勾配遠心を行って単離した。濃度はコレステロール測定キットにて決定した。ヒトマクロファージは、健常人末梢血より CD14 陽性細胞を単離し、MCF の添加でマクロファージに分化させた。TLR2 欠失ヒトマクロファージは、ヒトの単球系細胞株 THP1 細胞を用いて、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術で欠失させ、相同染色体に存在する二対の TLR2 遺伝子にフレームシフトが生じていることを DNA シーケンスで確認し、また TLR2 のリガンドである Pam3CSK4 の刺激が入らないことを確認して使用した。

4. 研究成果

結核菌抗原の ESAT6, CFP10, Antigen 85, Acr, MDP, HBHA および PPD に加え、新規をあわせて 16 種類の結核菌抗原を調整し、それぞれ健常者やマラリア感染患者を対照として、無症候結核菌感染者と結核患者の免疫応答を検討した。

CFP10 や ESAT6 に対する抗体価は、結核患者で高い一方、既報にあるように Antigen 85, Acr, MDP1 に加え新たに試験した抗原の一部に対しては無症候感染者で有意に高いことが分かった。また CFP10 や ESAT6 に対する免疫応答が検出できない結核患者を、試験した別抗原への応答を加えることで、より検出率が上昇することも確認した。一方で、結核菌の無症候感染

者で認識される抗原に対する免疫応答は、ESAT6 や CFP10 との応答とはオーバーラップしない傾向が認められた。以上の結果から CFP10 や ESAT6 など、結核患者(発症者)で応答の高い抗原と、無症候感染で検出される抗原応答性を組み合わせて、結核菌感染後の発症を予知できる可能性が示された。

血液生化学試験を実施し結核菌感染との相関を解析した結果、Mbita 地住民の検証で HDL コレステロール量と結核菌感染の相関が検出された。そこで結核菌の主要な感染細胞であるマクロファージの機能に対する HDL の作用を検証した。マクロファージを培養し、結核菌を感染する際に HDL を加えると、感染菌数が有意に増加することが分かった。同時に血清より分離した LDL にはそのような活性を認めなかった。

さらに結核菌感染成立後のマクロファージのサイトカイン応答をバイオプレックスで網羅的に検討した結果、TNF-alpha、IL-6、IFN-gamma、IL-10 の産生を認めたが、そのいずれもが、HDL の添加で濃度依存的に抑制されることが分かった。

特に最も産生が顕著で、且つ結核防御に必須であることから TNF-alpha の産生を指標に、産生抑制のメカニズムを解析した。まず、結核菌感染時におけるヒトマクロファージの TNF-alpha 産生がなにに依存するか解析した結果、結核菌感染後に TLR2 の転写量が増加し、TLR2 欠失ヒトマクロファージでは、TNF-alpha 産生が消失することを明らかにした。このことから、結核菌感染ヒトマクロファージにおける TNF-alpha 産生は、TLR2 依存的であることがわかった。

そこで TLR2 発現自体が、HDL によって影響されるかを検討した結果、結核菌感染によって増加する細胞表面の TLR2 が、HDL の添加で減少することが分かった。それに伴い、TLR2 の細胞内シグナリングの低下が観察された。

以上のケニア共和国での調査と検証から、HDL はマクロファージが結核菌感染によって産生する宿主防御的なサイトカインを TLR2 の発現抑制によって抑制することが分かった。本メカニズムが、結核菌感染の増加に関与していることが疑われた。

HDL コレステロールは一般に善玉コレステロールとして知られ、血管の老化を抑制することで成人病の予防に寄与する一方で、TLR2 で認識される病原体感染においては負的作用があることが示唆された。本研究成果について論文を執筆し、発表した(Inoue et al, *Sci Rep*, 2018)

以上、ケニア共和国における結核菌感染者のモニタリングの結果、結核菌抗原に対する免疫応答で、感染者の特定や発症の予知が可能である可能性が示された。また HDL が結核防御応答を抑制し感染や発症のリスクとなることを示した。本研究成果が普遍的なも

のであるかを、より多数のサンプル解析や、異なる地域での検証も必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. 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* In Press.
2. Chadeka, E. A., S. Nagi, T. Sunahara, N. B. Cheruiyot, F. Bahati, Y. Ozeki, M. Inoue, M. Osada-Oka, M. Okabe, Y. Hirayama, M. Changoma, K. Adachi, F. Mwendu, M. Kikuchi, R. Nakamura, Y. D. J. Kalenda, S. Kaneko, K. Hirayama, M. Shimada, Y. Ichinose, S. M. Njenga, S. Matsumoto, and S. Hamano. 2017. Spatial distribution and risk factors of *Schistosoma haematobium* and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005872.
3. Ozeki, Y., M. Igarashi, M. Doe, A. Tamaru, N. Kinoshita, Y. Ogura, T. Iwamoto, R. Sawa, M. Umekita, S. Enany, Y. Nishiuchi, M. Osada-Oka, T. Hayashi, M. Niki, Y. Tateishi, M. Hatano, and S. Matsumoto. 2015. A New Screen for Tuberculosis Drug Candidates Utilizing a Luciferase-Expressing Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gueren. *PLoS One* 10: e0141658.
4. Nagi, S., E. A. Chadeka, T. Sunahara, F. Mutungi, Y. K. Justin, S. Kaneko, Y. Ichinose, S. Matsumoto, S. M. Njenga, M. Hashizume, M. Shimada, and S. Hamano. 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.

5. 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.
6. 立石 善隆、松本 壮吉。結核菌の病原因子。呼吸器内科。29 巻、1 号、p65-70、2016
7. 松本 壮吉、西山 晃史、尾関 百合子。結核菌の潜伏感染に関わるメカニズムと新しい結核制御技術の可能性。化学療法の領域。31 巻、9 号、p93-100、2015
8. 松本 壮吉、結核菌の増殖制御や潜在性結核の解析および、結核ワクチンの開発研究。臨床と研究 別刷。92 巻、p116、2015
9. 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

〔学会発表〕(計 14 件)

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。東京都江戸川区
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。東京都江戸川区

3. Analysis of antigenicity and functions of mycobacterial proteins Shymaa Enany, 尾関 百合子, 西山 晃史, Anna Savitskaya, 立石 善隆, 阿戸 学, 山本格, 松本 壮吉 大阪 (日本細菌学会総会) 2016 3 月
4. 潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用 西田 由貴子, 北所 健悟, 尾関 百合子, 立石 善隆, 井上 学, 仁木 満美子, 金子 幸弘, 松本 壮吉 大阪 (日本細菌学会総会) 2016 3 月
5. HDL-cholesterol suppresses the production of cytokines from M. tuberculosis infected macrophages 井上 学, 仁木 満美子, 尾関 百合子, 岡 真優子, 尻 幸世, 一瀬 休生, 金子 幸弘, 濱野 真二郎, 松本 壮吉 大阪 (日本細菌学会総会) 2016 3 月
6. 松本 壮吉、結核の歴史や現状と、潜在性結核に学ぶ新しい結核制御法開発の試み。大阪 (熱帯医学会) 2015 12 月
7. 松本 壮吉、結核・抗酸菌の遅発育性や休眠現象と新しい抗酸菌症戦略の可能性、福岡 (福岡マイコバクテリオースシンポジウム) 2015 10 月
8. Sohkiichi Matsumoto、Diagnosis of TB infections、第 6 回国際結核肺疾患予防連合アジア太平洋地域学術大会、東京国際フォーラム (東京都千代田区)
9. 西田 由貴子、尾関 百合子、立石 善隆、西山 晃史、山本 三郎、中川 一路、松本 壮吉、潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用。第 90 回日本細菌学会総会、仙台国際センター展示棟 (宮城県仙台市) 2017 年 3 月 19-21 日
10. Sohkiichi Matsumoto、The risks of *Mycobacterium tuberculosis* infection. 51st Mycobacteria Panel Meeting, ホテルアンバサダー ホテル (韓国 ソウル市江南区) 2017 年 2 月 9-10 日
11. Sohkiichi Matsumoto、From biology of *Mycobacterium* to the development of the control strategies against tuberculosis. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 2017 年 5 月 18 日、Nagasaki, Japan
12. Desak Nyoman Surya Suameitria Dewi, Ni Made Mertaniasih, Soedarsono4, Yuriko Ozeki, and Sohkiichi Matsumoto. Antibody responses from tuberculosis patients in Surabaya, Indonesia against

- Mycobacterium tuberculosis* protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
13. Takeya Fujikawa, Ryoji Maekura, Seigo Kitada, Mayuko Osada-Oka, Yoshitaka Tateishi, Junko Ogawa, Masahide Mori and Sohkichi Matsumoto, Serum antibody profiles in individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. (LTBI) . US-Japan Cooperative Medical Science Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018/3/15-16 Niigata, Japan
 14. 大原由貴子 尾関 百合子 立石 善隆, 西山 晃史, 山本 三郎, 中川 一路, 松本 壮吉, 潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 26-28 日, 福岡市博多区 福岡国際会議場

〔図書〕(計 4 件)

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。
2. 松本 壮吉。南山堂医学大事典 改訂 20 版、鈴木 肇 代表。2015。
3. 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。
4. 松本 壮吉。シンプル微生物学、小熊 恵二、堀田 博、若宮 伸隆 編。マイコバクテリウム属、南江堂、東京、196-203、2018

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med-niigatauniv-bacteriol.org>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

濱野 真二郎 (HAMANO Shinji)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70294915

(3)研究分担者

阿戸 学 (ATO Manabu)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ

ー感染制御部・部長

研究者番号：20392318

(4)連携研究者

金子 聡 (KANEKO Satoshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00342907

(5)連携研究者

藤井 仁人 (FUJII Yoshito)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：40347498

(6)連携研究者

岡 真優子 (OKA Mayuko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00169301

(7)連携研究者

尾関 百合子 (OZEKI Yuriko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00169301

(8)連携研究者

前倉 亮治 (MAEKURA Ryoji)

刀根山病院・臨床研究部・副院長

研究者番号：60423886

(9)連携研究者

一瀬 休生 (ICHINOSE Yoshio)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70176296