

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591254
 研究課題名 (和文) 日本人における BCG 副反応および抗酸菌易感染性に関連する宿主遺伝要因の検索
 研究課題名 (英文) Search for genetic factors that confer susceptibility to severe BCG infection and other mycobacterial diseases in Japanese
 研究代表者
 佐々木 由佳 (SASAKI YUKA)
 九州大学・大学病院・特別教員
 研究者番号：00444810

研究成果の概要：

BCG 重症副反応を含む抗酸菌易感染例を集積し、その遺伝的背景を検索した。IL-12/IFN- γ 経路の分子をコードする遺伝子および *NEMO* 遺伝子のエクソンおよびイントロンのエクソン隣接領域の塩基配列を網羅的に解析したが、1 例において *NEMO* 遺伝子に新規遺伝子変異が認められたのみであった。日本人においては、BCG 重症副反応を含む抗酸菌易感染性には IL-12/IFN- γ 経路の以外の遺伝的要因の関与のほうが大きいと考えられた。IL-12/IFN- γ 経路に遺伝子異常がない症例について BCG 刺激単核球の cDNA マイクロアレイ解析を行ったが、一貫して対照と発現が有意に異なる遺伝子は見出せなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

結核菌や BCG をはじめとする抗酸菌は細胞内寄生菌であり、その免疫応答にはマクロファージ、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などの細胞が関与している。インターフェロン (IFN)- γ は、この中では主に CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞から分泌され、抗酸菌の排除に中心的な役割を果たしているサイトカインである。抗酸菌の侵入によりマクロファージや Dendritic cell よりインターロイキン (IL)-12 が分泌され、NK 細胞や T 細胞表面に特異的に発現している IL-12 受容体 (IL-12R) に結合する。続いて、IL-12R を介したシグナルと提示された抗原による T 細胞レセプターからのシグナルにより IFN- γ が分泌され、IFN- γ 受容体 (IFN- γ R) に結合する。その結果、signal transducer and activator of

transcription 1 (STAT-1) がリン酸化されて核内へ移行し、TNF- α 、MHC、IL-12 などの遺伝子が発現して貪食細胞が活性化され、抗酸菌排除が誘導される (IL-12/IFN- γ 経路)。

一方、BCG 接種は結核対策の柱であるが、副反応として稀に骨髄炎などの全身播種をきたすことがある。近年、明らかな細胞性免疫不全のない BCG 重症副反応例の中に、IL-12/IFN- γ 経路の異常を有する症例が存在することが明らかになった。1996 年以降、フランスを中心に BCG や環境中の非定型抗酸菌など病原性の低い抗酸菌に対する易感染性の原因として IL-12/IFN- γ 経路のサイトカイン/サイトカイン受容体/シグナル伝達物質である IL-12p40、IL-12R β 1、IFN- γ R1、IFN- γ R2 および STAT-1 をコードする遺伝子の異常が相次いで報告されており、

mendelian susceptibility to mycobacterial infection (MSMD) (MIM209950) と総称されている (Casanova et al. *Ann Rev Immunol*, 2002)。本経路のサイトカインおよび受容体は、細胞内寄生性細菌の排除に重要な役割を果たすため、BCG や非定型抗酸菌のみならず結核菌やサルモネラ属など他の細胞内寄生菌に対する易感染性にも関与している。

研究代表者らは、BCG、非定型抗酸菌に対して易感染性を示した症例について IL-12/IFN- γ 経路の遺伝子解析を行い、優性遺伝形式をとる IFN- γ R1 部分欠損症の 4 症例 (うち 2 例は父子例) を本邦で初めて報告した (Sasaki et al. *J Infect Dis*, 2002)。

2. 研究の目的

BCG その他の抗酸菌による重症/反復感染症症例を集積して解析し、わが国における抗酸菌易感染性の遺伝的背景を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BCG その他の抗酸菌による重症/反復感染症症例の集積および IL-12/IFN- γ 経路関連遺伝子と *NEMO* 遺伝子の解析

① 検体の採取

BCG その他の抗酸菌による重症/反復感染症症例の血液を収集する。研究分担者の高田らの全国調査により明らかになった症例と全国の施設から解析を依頼された症例を主な対象とする。

② DNA の分離、RNA の分離、RT-PCR

収集した血液は DNA 抽出キット (QIAamp Blood kit) を用いて DNA を分離する。RNA 抽出キット (Isogen) を用いて total RNA を分離し、これより First Strand cDNA 合成キット (Amersham Biosciences) を用いて cDNA を合成する。PCR は PCR キットを用いて行う。

③ シークエンス

DNA、cDNA から、PCR 法により対象遺伝子の全エクソンおよび全イントロンのエクソン隣接領域の塩基配列を網羅的に増幅しそれぞれの PCR 産物をダイレクトシークエンシングにて塩基配列を決定する。

④ 遺伝子変異の検討

以上のスクリーニング結果をもとに、遺伝子変異の存在の有無をコンピューターソフトを用いて各 PCR フラグメント毎に塩基配列を比較検討する。解析対象とした遺伝子は以下のとおりである。() 内はその遺伝子がコードする分子を示す。

IFNGR1 (IFN- γ R1)、*IFNGR2* (IFN- γ R2)、*IL12B* (IL-12p40)、*IL12RB1* (IL-12R β 1)、*STAT1* (STAT-1)、*NEMO* (NF- κ B essential modulator [NEMO])。

(2) cDNA マイクロアレイを用いた末梢血単核球における mRNA 発現の網羅的解析に基づく

BCG その他の抗酸菌による重症/反復感染症例の感受性遺伝子の探索

BCG その他の抗酸菌による重症/反復感染症患者および健康成人から採血し、末梢血単核球を分離する。BCG による刺激後、24 時間培養し、RNA 抽出キット (Isogen) を用いて total RNA を分離する。amino Allyl MessageAmp aRNA kit (Ambion) を用いて、amino Allyl anti-sense RNA を増幅する。Cy3、Cy5 (Amersham Biosciences) で標識する。AceGene human Oligo 30K (日立ソフト) の oligo chip に hybridize させ、FLA-8000 (Fuji photo film) で scan する。得られたデータを Array Vision (Amersham Biosciences) で数値化し、Gene Spring (Agilent) で解析する。

4. 研究成果

(1) BCG その他の抗酸菌に対する易感染性に関する全国調査

国内の小児科を有する病院 (667 施設) へのアンケート調査を行った。一次アンケートで、以下の①~⑥に該当する過去 5 年間の患者を集計し、二次アンケートでその詳細について検討した。

① いわゆる細胞内寄生性細菌に対する免疫不全症の患者

② BCG 骨髄炎/関節炎 (疑い例も含む)

③ その他の播種性 BCG/非定型抗酸菌感染症

④ 抗酸菌、サルモネラ、リステリアによる感染症の反復

⑤ 繰り返す結核や難治性重症結核

⑥ 家族歴等から細胞内寄生性細菌に対する免疫不全症が疑われる

一次アンケートの回収率は 68% であった。一次アンケートの結果から、32 名がいわゆる MSMD に該当した。患者年齢の中央値は 8 歳 (6 か月~41 歳)、発症年齢 (最初の感染症発症) の中央値は 1 歳 4 か月 (4 か月~6 歳 4 か月) であった。男女比は 2.3:1 で男児に多かった。血族結婚はなかった。感染症の原因としては BCG が最も多く、59% の患者が BCG 感染症を発症していた。BCG 感染症の中では骨髄炎/関節炎が 63% と最も多かった BCG 感染症を発症した患者のうち、2 例 (11%) が肝脾腫を伴っていた。BCG 接種から初回の BCG 感染症発症までの期間の中央値は 6.5 か月 (2 か月~1 年 8 か月) であった。非定型抗酸菌感染症は 34% に認められた。32% の患者は BCG を含む抗酸菌感染症を 2 回以上発症しており、19% の患者は 3 回以上発症していた。5 回抗酸菌感染症を発症した例が 1 例認められた。サルモネラ感染症やリステリア感染症に罹患した例はなかった。

32 例中 27 例について遺伝子解析が行われ、4 家系 5 例が優性遺伝形式をとる IFN- γ R1 部分欠損症であった。この 5 例はいずれも

IFN- γ R1 の細胞内ドメインに相当する部位の heterozygous な遺伝子変異であり、1 例は 774de14, 1 例は 811de14, 3 例が 818de14 であった。いずれの症例でも IFN- γ R1 の発現が亢進していることがフローサイトメトリーで確認された。5 例中 4 例が BCG 感染症を発症していた。

フランスにおける MSMD の集計では男女比は 1:1 で血族結婚の割合が高いとされており、本邦では本症の遺伝的背景が異なる可能性が示唆された。MSMD に伴う感染症の起炎菌としては BCG が最も多かった。遺伝子異常としては優性遺伝形式をとる IFN- γ R1 部分欠損症が同定されているが、32 例中 5 例にとどまっていた。

(2) BCG その他の抗酸菌による重症／反復感染症症例の集積および IL-12/IFN- γ 経路関連遺伝子と *NEMO* 遺伝子の解析

研究期間終了までに BCG 重症副反応を含む抗酸菌易感染例を新たに 28 例集積した (BCG 骨髄炎 16 例、播種性/深部 BCG リンパ節炎 4 例、BCG 皮膚炎/皮下膿瘍 3 例、重症結核 2 例、非定型抗酸菌感染症 3 例)。

このうち 2009 年 1 月までに検体が得られた 26 例について *IFNGR1* 遺伝子、うち 18 例についてはさらに、*IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, *NEMO* の各遺伝子の全エクソンおよび全イントロンのエクソン隣接領域の塩基配列を網羅的に解析した。その結果、1 例において *NEMO* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う新規遺伝子変異が認められた。この変異と抗酸菌易感染性との関連について、現在 *in vitro* での機能解析を行っている。

以上の結果より、日本人においては、BCG 重症副反応を含む抗酸菌易感染性には IL-12/IFN- γ 経路の以外の遺伝的要因の関与のほうが大きいと考えられた。

(3) 末梢血単核球における mRNA 発現の網羅的解析に基づく BCG その他の抗酸菌による重症／反復感染症例の感受性遺伝子の探索

これまでに集積した BCG 骨髄炎症例の中で、*NEMO* 遺伝子を除く上記の 5 遺伝子に加えて *IL23* (p19)、*IL23R*、*IL-27* (p28)、*IL-27R* (WSX-1) にも異常を認めなかった 3 例について、Cytokine CHIP (242spots)、AceGene Human Oligo Chip 30K (30,000 spots) を用いて、正常対照との間で BCG 刺激単核球の cDNA マイクロアレイ解析による比較を行ったが、3 例に一貫して対照と発現が有意に異なる遺伝子は見出せなかった。今後は、多数のマーカー 1 塩基多型 (SNP) を用いた genome-wide 関連解析など別の網羅的解析法を用いて候補遺伝子を絞り込むアプローチが必要であると考えられる。

(4) 成人の重症 BCG 副反応の基礎疾患としての慢性肉芽腫症

25 歳男性。4 か月時に左上腕に BCG 接種。その数か月後に左腋窩リンパの腫張をきたし切除を受けた。4 歳時、当科で兄が慢性肉芽腫症 (CGD) (*gp91^{phox}* 欠損) と診断された際に、同一疾患と診断された。その頃より黄色ブドウ球菌による皮膚感染を繰り返していた。その後同部位の異常はみられなかったが、肛門周囲膿瘍で一度入院加療を受けた。3 年前 (22 歳) より左腋窩の腫瘤に気付いていた。1 か月前頃より左鎖骨上窩と左頸部の多発性の腫瘤にも気づき、また夜間に 37°C 台の微熱がみられるようになったため、精査のため入院した。身体所見では、皮膚：頭部に化膿性皮膚潰瘍多発し、リンパ節は、左頸部 1cm 大、左鎖骨上窩 2cm 大、左腋窩 3cm 大にそれぞれ腫大していた。入院後、左鎖骨上窩リンパ節生検を施行したところ、塗抹検査にて抗酸菌陽性であり、4 剤による抗結核療法を開始したが、副作用のため INH、SM のみで治療を継続した。その後、生検組織から抗酸菌が分離され、日本ビーシー製造株式会社中央研究所にて分析の結果、BCG Tokyo 株と同定された。治療開始後、リンパ節腫脹は軽快傾向にある。

成人の BCG リンパ節炎は、HIV 感染者や BCG 膀胱内注入療法後を受けた膀胱癌患者で報告されているが、CGD 患者での報告は検索した範囲では見出せなかった。本症例における BCG リンパ節炎は先天性の宿主要因による BCG の遅発性合併症であり、食細胞の機能異常では BCG が 20 年以上の長期にわたって食細胞内で生存し再増殖により疾患を惹起しうること、成人の重症 BCG 副反応では CGD も基礎疾患の 1 つとなりうることを示している。本症例は CGD による易感染性が比較的軽度であり乳児期早期に本症と診断されて BCG 接種を避けることは困難であったと考えられる。しかし、2005 年 4 月より BCG の接種月齢が 6 か月未満に引き下げられたことは、CGD 患児が BCG を受けるリスクの全般的な増加につながると考えられ、今後同様の症例が増える可能性がある。また、本症例においては QuantiFERON-TB2G は陰性であったことから、原発性免疫不全症においては BCG が起炎菌となりうるが、IFN- γ 産生能が正常な場合には結核との鑑別に本検査法が有用であることが示された。

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 10 件)

① 楠原浩一、高田英俊、原寿郎 : 結核菌/非結核性抗酸菌に対する易感染性と IFN- γ /IL-12 経路。

日本サルコイドーシス／肉芽腫性疾患学会
雑誌 27: 9-19, 2007.

② Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K, Mizuno Y, Hara T:

Association of *IL12RB1* polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes.

Int J Immunogenet 34:35-44, 2007.

③ Furuno K, Takada H, Yamamoto K, Ikeda K, Ohno T, Khajoev V, Mizuno Y, Hara T: Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and coronary artery lesions in Kawasaki disease.

J Pediatr 151:155-60, 2007.

④ Kusuhara K, Nakao F, Saito M, Nakamura K, Ieiri S, Taguchi T, Hara T:

Pyogenic splenic abscess in an infant with serological evidence of cat scratch disease.

Eur J Pediatr 166:1289-91, 2007.

⑤ Kusuhara K, Ohga O, Hoshina T, Saito M, Sasaki Y, Ishimura M, Takada H, Fujita M, Hara T:

Disseminated *Bacillus Calmette-Guérin* lymphadenitis in a patient with gp91phox (-) chronic granulomatous disease 25 years after vaccination.

Eur J Pediatr (Epub ahead of print), 2008.

⑥ Kusuhara K, Saito M, Sasaki Y, Hikino S, Taguchi T, Suita S, Hayashi J, Wakatsuki K, Hara T:

An echovirus type 18 outbreak in a neonatal intensive care unit.

Eur J Pediatr 167:587-89, 2008.

⑦ Takada H, Ishimura M, Inada H, Ohga S, Kusuhara K, Moroi Y, Furue M, Hara T:

Pyogenic splenic abscess in an infant with serological evidence of cat scratch disease.

Eur J Pediatr 166:1289-91, 2007.

⑧ Khajoev V, Saito M, Takada H, Nomura A, Kusuhara K, Yoshida S, Yoshikai Y, Hara T:

Novel roles of osteopontin and CXCL12 chemokine ligand 7 in the defense against mycobacterial infection.

Clin Exp Immunol 143: 260-8, 2007.

⑨ Hoshina T, Kusuhara K, Ikeda K, Mizuno

Y, Saito M, Hara T.

High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease.

Scand J Rheumatol. 37:445-9, 2008

⑩ Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Sanefuji M, Yukaya N, Hara T:

Association of TLR3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis.

J Neurovirol (Epub ahead of print), 2008.

[学会発表] (計 2 件)

① 楠原浩一、保科隆之、齋藤光正、大賀正一、原 寿郎:

BCG 接種後 20 年以上を経て BCG リンパ節炎を発症した慢性肉芽腫症の 1 例
第 82 回日本感染症学会 (平成 20 年 4 月 17 日~18 日、松江)

② Kusuhara K, Yamamoto K, Hara T:

Association of *IL12RB1* polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes.

第 84 回日本結核病学会 (平成 21 年 7 月 2 日~3 日、札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 由佳 (SASAKI YUKA)
九州大学・大学病院・特別教員
研究者番号: 00444810

(2) 研究分担者

楠原 浩一 (KUSUHARA KOICHI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 20243941

高田 英俊 (TAKADA HIDETOSHI)
九州大学・大学病院・特任准教授
研究者番号: 70294931

保科 隆之 (HOSHINA TAKAYUKI)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号: 30398078