

結核・非結核性抗酸菌症の制圧をめざした研究

立石善隆

新潟大学医学部細菌学教室

Bacteriological Research to Control Tuberculosis and Non-tuberculous Mycobacteriosis

Yoshitaka TATEISHI

Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine

要 旨

抗酸菌は、ヒトへの病原性（伝播性と潜在感染）と細菌学的特性（脂質豊富な細胞壁構造と薬剤不応性）の両面で特殊性が高く、抗酸菌の研究成果は結核・非結核性抗酸菌症の臨床診断と治療に直結する。新規抗結核薬の開発は、6か月を要する現在の標準化学療法（改善、および多剤耐性結核に対する化学療法の改善を行う上で、必須のものである。第一段階として、数万から数十万単位の数の化合物を対象に、high throughput screening をおこない抗菌活性のある化合物を同定する。第2段階として、同定した化合物から、側鎖の修飾等により構造-活性連関を検討しリード化合物を得る。得られたリード化合物に対して、マイクロアレイによる転写活性プロファイル解析や耐性菌株の取得により、作用標的部位を同定する。次世代シーケンサーの登場により、自然耐性株の取得による作用機序の解明が主流になりつつある。しかし、予想に反して標的変異株が取得できない薬剤（特にプロドラッグ）も存在するため、新規抗結核薬の作用機序解明は、いまなお努力と時間を要する仕事である。一方、*Mycobacterium avium*-intracellular complex (MAC 菌) は、環境常在菌・人獣共通病原体である点で結核菌と大きく異なる。近年、肺 MAC 症は中高年女性を中心に現在急増している（罹患率 15 以上/10 万人年）が、その臨床病態の進行には菌種特異的な病原因子が係ることが示唆された。つまり、臨床病態の進行と細菌学的病原性の合致する菌株が存在し、プロフェージや多数の菌種特異的な遺伝子の保有が、菌株特有の病原性と臨床病態の進行性との関係を支持する。さらに、MAC 菌は glycopeptidolipid (GPL) という MAC 菌に特異的な糖脂質を産生し、細胞壁の表面に発現している。この GPL がバイオフィルムの発育に必須であることが証明され、GPL が浴室環境（給湯口、シャワーヘッド）の感染源、あるいは生体内における菌の生存戦略に重要な役割を果たすことが示唆された。このように、結核菌・非結核性抗酸菌の細菌学的性質を理解することは、創薬、ワクチン、感染予防対策確立の土台となるものであり、結核・MAC 症の制圧に大きく貢献する。

キーワード：結核, 新規抗結核薬, *Mycobacterium avium*-intracellular complex, バイオフィルム

Reprint requests to: Yoshitaka TATEISHI
Department of Bacteriology,
Niigata University School of Medicine,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医学部細菌学教室 立石善隆

緒 言

2013年の世界保健機関の統計によると、結核は年間新規患者960万人、死者150万人をもたらしている。さらに、多剤耐性結核(MDR-TB)は新規発症者の3.3%を占め、MDR-TBによる死者は1900万人にも及ぶ。このように、結核は現在もなお人類の脅威となる感染症であるにもかかわらず、イソニアジド、リファンピシンを主軸とした治療法の登場50年を経過してもなお、新規治療法の開拓が進まない。一方、*Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 症を中心とした非結核性抗酸菌症は、わが国において1990年代より急増しており、現在人口10万対15ないしそれ以上に達する¹⁾。しかし、薬剤不能性の細菌学的性質と複雑な臨床病態のゆえ、MAC症に対しての画期的治療も未開発の状況である。著者は、細菌学的性質の理解により結核の制圧、およびMAC症の制圧ができないかと考え、新規抗結核薬、およびMAC菌の病原因子の探索を行ってきたので、ここに紹介する。

新規抗結核薬の探索と作用機序の解明

a. High throughput screeningによる化合物ライブラリーのスクリーニング

抗結核薬の探索は、i) 実験が生物学的封じ込めレベル3の施設内に限定される、ii) 脂質豊富な細胞壁成分のゆえ、薬剤の細胞内への到達が困難であり抗菌効果が発現しにくい、iii) 結核菌の休眠・潜伏感染の棲家であるマクロファージ内では、低酸素・低pH状態であるため、抗菌薬としてはそのような条件下でも生物学的有効性を示す必要がある、という点で困難を伴う。High throughput screeningには大別して、whole cell screeningとtarget-based screening (structure-based screening)の2種類がある。前者は、作用機序や標的部位に拘泥せず、被験化合物をじかに結核菌に作用させ、抗菌作用のあるものを釣り上げていく方法である。後者は、結核菌の生存必須遺伝子を標的として、その遺伝子をコードするタンパク

に対する阻害薬をデザインする方法であるが、多くの場合、結核菌そのものの増殖を抑制できないという結果に陥る。そのため、探索の初期から、hit化合物とstructure-based designを連携させたwhole cell screeningが、創薬への近道と考えられる(図1A)。具体的には、化学インフォマティクスによる構造活性連関の推定や、炭素源の異なる数種類の培地を用いて細胞外・細胞内の環境条件と類似させたスクリーニングを行うことで、効率的なhit化合物の探索を行う。スクリーニングには、ルシフェラーゼ発現菌株と384穴プレートを用いることにより、ウェル中の生存菌量の自動測定を行い、抗菌薬として有望な化合物(hit化合物)を見出す。

b. 標的部位の同定

Hit化合物が得られれば、化合物側鎖の修飾等によるリード化合物の作成と、マニュアル作業による最小発育阻止濃度(MIC)測定を行い、構造活性連関(structure-activity relationship; SAR)を検討する。その中で最も抗菌活性が高いものは、リード化合物として以後の解析に使用する。

標的部位の同定には、図1Bに示すように、マイクロアレイによる転写プロファイル解析、耐性菌株の取得、macromolecular incorporation assay、メタボローム解析、構造活性連関(SAR)、抗菌スペクトル、細胞毒性試験、低酸素条件における殺菌活性、最小殺菌濃度測定、マクロファージ内での殺菌効果の検討を行う。特に、前3者は、化合物の作用機序の解明に非常に有効な手段であり、以下に概説する。

耐性菌株の取得は、化合物含有寒天平板培地で増殖したコロニーを取得することで行う。耐性菌株取得方法には、大別して3種類ある。自然耐性株の誘導、トランスポゾンを用いた変異株の誘導、化学物質による変異誘発であり、それぞれの長所と短所を図1Cに示した。標的変異株取得の難易度は、供与菌数と薬剤濃度のバランス、化合物特有の化学的性質によりさまざまである(図1D)。一般的には、プロドラッグの標的部位の同定は難易度が高い。その理由は、耐性菌株の大部分が薬

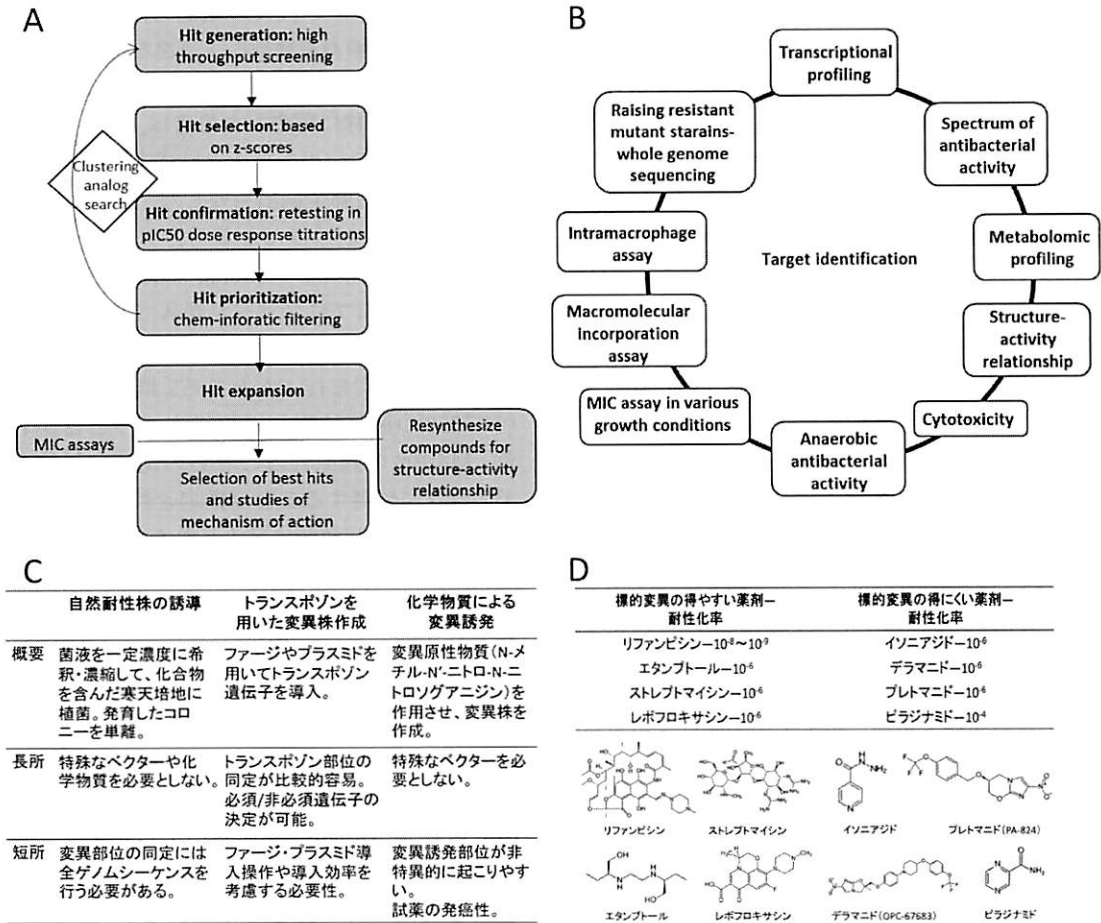


図1 新規抗結核薬の探索の流れと耐性菌株の取得

- A：High throughput screening による hit 化合物の探索。ルシフェラーゼ発現菌株の使用，化学インフォマティクスによる構造活性連関の推定，結核菌の増殖・休眠特性を模した諸種培地の利用により，効果的なスクリーニングを行う。
- B：標的部位の同定。マイクロアレイによる転写プロファイル，耐性菌株の取得，macromolecular incorporation assay など駆使して，化合物の作用機序を解明する。
- C：耐性菌株の取得方法。次世代シーケンサーの登場以来，自然耐性株の誘導による耐性菌株の取得方法が普及してきた。
- D：抗結核薬に対する標的変異株取得の難易度。結核菌内で活性体となる薬剤（プロドラッグ）では，代謝酵素遺伝子の変異株が得られがちであるため，標的変異株の取得に工夫を要する。

剤活性化に与る酵素遺伝子の変異株であるためである。事実，イソニアジド，PA-824（プレトマニド），ピラジナミドの標的部位が同定されたのは，それぞれ1994年，2008年，2011年であり，標的部位同定の困難さを裏付ける^{2)–4)}。

転写プロファイル解析では，化合物を作用させた結核菌からRNAを抽出し，マイクロアレイにより遺伝子発現パターンを網羅的に検討する⁵⁾。得られたデータに対して，クラスター解析（各種阻害剤における発現パターンと比較して，どの阻

害剤と同じグループに属するか。例えば、蛋白翻訳, mRNA 転写, 呼吸鎖, ペプチドグリカン合成, DNA 障害, 転写活性上昇を認めた遺伝子群の同定, そして転写活性の上昇していた代謝経路のリスタアップ (パスウェイ解析) を行う。

Macromolecular incorporation assay は、化合物が、どの生体高分子の合成を阻害するかを検討するためのアッセイである。前駆体分子としては、 ^3H -uracil (DNA/RNA), ^3H -leucine (タンパク), ^3H -N-acetylglucosamine (ペプチドグリカン), ^3H -acetate (脂肪酸), ^3H -glucose (糖) などを用いる。放射能でラベルした前駆体分子を結核菌と混和し、前駆体分子の菌体内への取込量をシンチレーションカウンターで測定する⁶⁾。

MAC 菌の研究

MAC 菌は結核菌と異なり、自然環境中の常在菌であり、かつトリやブタ等の家畜を宿主とする人畜共通病原体である。元来薬剤不能性であることから、ヒトにおける MAC 症の治療難渋性と関連する。また、MAC 菌の臨床菌株は結核菌の場合と比べて、ゲノム多様性をもつことが知られている。反復配列多型 (VNTR) によるゲノム型別を行ったところ、日本でのヒト由来菌株は生活環境中の菌株と近縁である一方、欧州でのヒト由来菌株は、ブタ等の家畜菌株と近縁であることが判明した⁷⁾。このことは、浴室給湯口とシャワーヘッドが感染源となることを示した報告と整合している⁸⁾ (図 2A)。

肺 MAC 症の臨床病態は、空洞形成性の結核類似型と結節性病変と気管支拡張病変を示す結節・気管支拡張型に分類される。とくに後者は、中高年女性に好発し、昨今の肺 MAC 症患者急増の主体となっている。MAC 症の臨床経過は症例によってさまざまであるものの、進行性に経過し致死に至る症例も存在する。予後は、宿主免疫能と細菌学的病原性のバランスで決められると考えられるが、細菌学的病原性と臨床病態の進行性については不明確であった。著者は、肺 MAC 症患者由来の臨床菌株 (進行例 3 株、安定例 3 株) につい

て、マクロファージ内での増殖力、マウス経気道感染時での増殖力を検討し、急速な臨床経過に合致した高病原性 MAC 菌株 M.i.198 を同定した⁹⁾ (図 2B)。本菌株に罹患した患者は、初診からわずか 3 年の経過で病巣の拡大と肺構造の破壊をきたし、最終的に右肺全摘出を要した。M.i.198 のゲノムシーケンスを行ったところ、ゲノムサイズは 5.22 Mb であり、55 の coding sequence を含んだ 51 kb におよぶプロファージが入っていることが判明した¹⁰⁾。各遺伝子の相同性について best-hit BLAST 検索を行ったところ、既報の菌株に比べて 358 の菌株特異的遺伝子をもつことがわかり、M.i.198 の病原性はこれらの菌種特異的遺伝子の存在に依拠することが推定された (図 2C)。

MAC 菌は、結核菌にはみられない、glycopeptidolipid (GPL) という特有の糖脂質を有する。GPL は、30 程度の炭素数をもつ脂肪酸からなる疎水基と糖ペプチド部位からなる親水基をもち、両親媒性を示す。ブドウ球菌や緑膿菌など多くの一般細菌は、自然環境中の生存区域をバイオフィーム形成により確保している。抗酸菌では、MAC 菌を含めた各種非結核性抗酸菌、および迅速発育菌である *M. smegmatis* においてバイオフィーム形成が知られていたが、バイオフィーム形成機序および現象の普遍性までは検討されていなかった。著者は、大阪市立大学刀根山結核研究所の西内由紀子博士と共同で、環境分離 MAC 株のバイオフィーム形成を検討し、MAC 菌特有の GPL がバイオフィーム発育に最も重要な分子であることを見出した (論文投稿中)。興味深いことに、GPL 保有の野生株が形成したバイオフィームには、多くの菌が集簇し、swarming をうかがわせるような配列を呈するが、GPL を欠損したラフ型菌株が形成したバイオフィームには、ごくわずかの菌しか定着せず、菌サイズも縮小していた。しかも、双方のバイオフィームとも、次亜塩素酸には耐性であった。これらの所見は、バイオフィーム発育における GPL の重要性を示している。さらに、野生株とラフ型菌株におけるバイオフィーム形成パターンの相違は、MAC 菌が GPL を利用した効率的な生存戦略をもつことをうかがわせる。2012 年

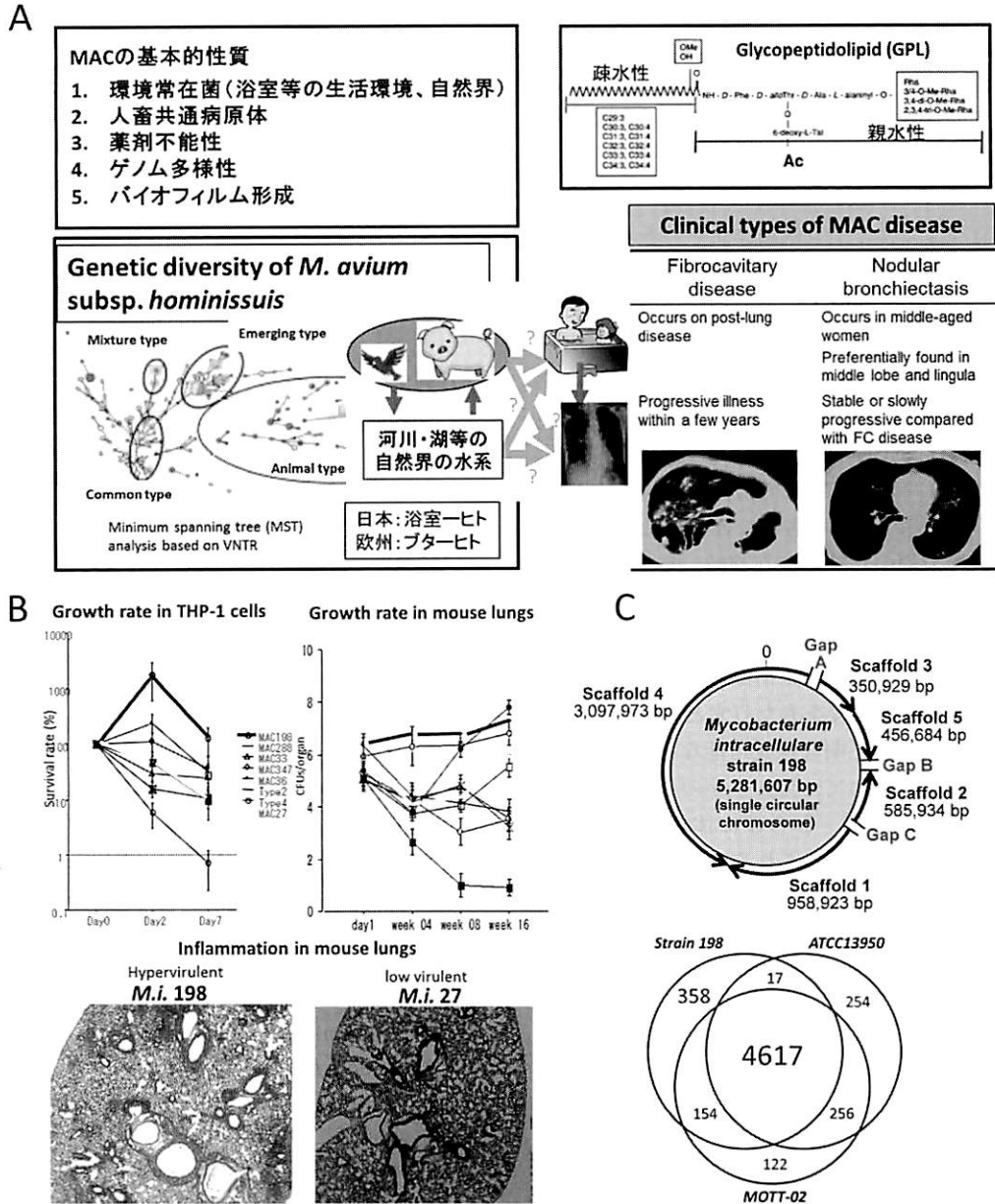


図2 MAC菌の細菌学的性質と高病原性菌株の同定

- A: MAC菌の細菌学的性質. MAC菌は結核菌と異なり、環境常在菌かつ人畜共通病原体である。わが国のMAC菌感染源は、浴室(給湯口やシャワーヘッド)に由来する。Glycopeptidolipid (GPL) という両親水性の糖脂質が、バイオフィルムの形成と発育に関与する。
- B: 急速な臨床経過に合致した高病原性MAC菌株の同定。 *M. intracellulare* M.i.198は、3年の間に急速に病巣が進行した患者に由来した菌株であり、マクロファージ内およびマウス肺内で他の臨床菌株と比べて、増殖・生存率が高かった。
- C: M.i.198の全ゲノムシーケンス。既報の *M. intracellulare* ゲノム解読菌株と比較したところ、M.i.198は51 kbにおよぶプロファージと、358の菌株特異的遺伝子を保有していた。

に臨床検査として保険収載されたキャピリア MAC は、この GPL の core 脂質に対する IgA 抗体価を測定するものである¹¹⁾。このように、GPL の生物学的活性は研究および臨床双方において重要視されている。

現在、著者は MAC 菌の研究を、主に二つの方向から行っている。一つは遺伝子レベルによる病原性発現機構の解明である。MAC 菌は結核菌と比べて、プラスミド導入による遺伝子改変が困難である。そこで、*M. avium* 由来のファージを使って、ゲノム上無作為的にトランスポゾンを導入することで変異ライブラリーを作成し、バイオフィルム形成機序および病原因子の発現機構を解析している。もう一つは、生体恒常性改善を指向した MAC 症治療法の探索である。著者が前任地（国立病院機構刀根山病院）に在籍時、慢性呼吸器疾患患者に対するグレリン投与臨床試験に関わり、グレリンが、呼吸困難感・QOL・運動耐容能などの臨床症状の改善、栄養指標の改善、好中球性の慢性気道炎症の改善をもたらすという知見を得た¹²⁾。臨床現場に早期に還元可能な MAC 症治療法の探索の一つとして、グレリンの MAC 菌に対する抗菌作用の検討、ならびに体組成改善（筋肉・筋肉）によりもたらされる抗菌効果についての細胞生物学的検討を行っている。

結 語

抗酸菌が他の細菌に比べて極めてヒトとの関わり合いが強いことは、結核菌におけるヒトからヒトへの伝播性および潜在感染（休眠）と再燃、MAC 菌における感染様式（生活環境—ヒト）およびバイオフィルム形成能により如実に示されている。これらの現象のメカニズムを理解することは時間と労力を伴う反面、やりがいのある仕事でもある。わが国のみならず、世界全体において、結核・非結核性抗酸菌症に対する創薬・ワクチン・疫学的感染予防対策の進歩が期待される。

謝 辞

上記の研究を行う機会を与えていただいた、前任地の国立病院機構刀根山病院、大阪市立大学医学部細菌学教室、米国公衆衛生研究所結核研究部門に感謝申し上げます。殊に、松本壮吉教授には大阪市立大学細菌学教室の時代から親身になって支援していただき、深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 御手洗 聡：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。厚生労働省科学研究委託費（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，平成26年度委託業務成果報告書：9-14，2015。
- 2) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G and Jacobs WR Jr: inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263: 227 - 230, 1994.
- 3) Singh R, Manjunatha U, Boshoff HI, Ha YH, Niyomrattanakit P, Ledwidge R, Dowd CS, Lee IY, Kim P, Zhang L, Kang S, Keller TH, Jiricek J and Barry CE 3rd: PA - 824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 322: 1392 - 1395, 2008.
- 4) Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3rd, Wang H, Zhang W and Zhang Y: Pyrazinamide inhibits trans - translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333: 1630 - 1632, 2011.
- 5) Boshoff HI, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA and Barry CE 3rd: The transcription - al responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem* 279: 40174 - 40184, 2004.
- 6) Tahlan K, Wilson R, Kastrinsky DB, Arora K, Nair V, Fischer E, Barnes SW, Walker JR, Alland D, Barry CE 3rd and Boshoff HI: SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation

- to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1797 - 1809, 2012.
- 7) Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y and Nasu M: Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect Genet Evol* 12: 846 - 852, 2012.
- 8) Nishiuchi Y, Maekura R, Kitada S, Tamaru A, Taguri T, Kira Y, Hiraga T, Hirotsu A, Yoshimura K, Miki M and Ito M: The recovery of *Mycobacterium avium* - *intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clin Infect Dis* 45: 347 - 351, 2007.
- 9) Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Nishiuchi Y, Yoshimura M, Kang J, Shibata A, Hirata K, Kitada S, Maekura R, Ogura H, Kobayashi K and Matsumoto S: Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb Pathog* 46: 6 - 12, 2009.
- 10) Tateishi Y, Kitada S, Miki K, Maekura R, Ogura Y, Ozeki Y, Nishiuchi Y, Niki M, Hayashi T, Hirata K, Kobayashi K and Matsumoto S: Whole - genome sequence of the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. *J Bacteriol* 194: 633, 2012.
- 11) Kitada S, Kobayashi K, Ichiyama S, Takakura S, Sakatani M, Suzuki K, Takashima T, Nagai T, Sakurabayashi I, Ito M and Maekura R; MAC Serodiagnosis Study Group: Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 793 - 797, 2008.
- 12) Miki K, Maekura R, Nagaya N, Nakazato M, Kimura H, Murakami S, Ohnishi S, Hiraga T, Miki M, Kitada S, Yoshimura K, Tateishi Y, Arimura Y, Matsumoto N, Yoshikawa M, Yamahara K and Kangawa K: Ghrelin treatment of cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, randomized, double - blind, placebo - controlled trial. *PLoS One* 7: e35708, 2012.
-