

結核とリーシュマニアの新規治療標的の探索

実施予定期間：平成 22 年度～平成 24 年度

代表機関：(独) 理化学研究所オミックス基盤研究領域 LSA
要素技術開発グループ

代表者：鈴木 治和

国内参画機関：

代表者：

国外参画機関：ケープタウン大学

代表者：Frank Brombacher

I. 概要

共同研究者が持つ独自の遺伝子改変モデルマウスを用いて、結核やリーシュマニア症の急性期、潜伏期、再活性化期での病原体感染サンプルを作成し、日本側が保持する革新的な大規模トランスクリプトーム解析を実行する。バイオインフォマティクスで宿主-病原体の相互作用を解析し、関与する宿主側の遺伝子、情報伝達経路を同定する。これら遺伝子の詳細な役割を精査し、最終的に薬剤標的になる重要遺伝子を絞り込む。

1. 共同研究の内容

a. 課題の背景

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる地球規模の疾患であり、WHO の報告によると、全世界人口の 3 分の 1、約 20 億人に潜伏感染している。毎年、全世界で 800 万人が結核を発症し、200 万人がこの病気で死亡している。急性の結核症状に対しては様々な抗生物質が用いられるが、耐性菌出現の問題が深刻化している。また、病原体は潜伏感染するが、保菌者の 10% は、生涯のうちどこかで、結核菌が再活性化し、治療しなければ重篤な病状となる。

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫が原因の風土病であり、3 大陸 88 カ国において 1500 万人の感染者および 3.5 億人の感染リスクをかかえる人が存在する。リーシュマニア症は結核同様に WHO が十大感染症と認定するもののひとつであり、非常に限られた治療薬しか存在せず、また有効なワクチンは現在のところ存在しない。ヒトリーシュマニア症は、アフリカ大陸では HIV との複合感染の進行が深刻な問題となっている。

結核菌はマクロファージ細胞内に好んで存在し、増殖している。これは結核菌がマクロファージ細胞内の情報伝達経路を搾取し破壊することにより、微生物殺傷能力 -- ヘルパー T 細胞の TH1 免疫反応と IFN ガンマや TNF により、古典的に活性化されたマクロファージ細胞 (caMph) が殺傷因子としてニトロオキシドを発生させることから免れるからである。最近、ヘルパー T 細胞の TH2 免疫反応と IL-4 や IL-13 によって別経路で活性化されたマクロファージ細胞 (aaMph) が、潜伏していた結核菌の再活性化と細胞内での持続に関与することがわかってきた。

リーシュマニア感染でも、宿主は TH1 免疫反応と IFN ガンマや TNF により古典的に活性化されたマクロファージ細胞 (caMph) の微生物殺傷能力で対抗しようとする。しかしながら、IL-4 によって活性化されるヘルパー T 細胞の TH2 免疫反応が仇になって、リーシュマニアの感染を許してしまうことが分かってきた。南ア側の共同研究者は、最近、別経路によって活性化されるマクロファージ細胞 (aaMph) が生成しない遺伝子改変マウスを作成することに

成功した。驚いたことに、この遺伝子改変マウスではリーシュマニアの感染が成立せず、このことから、リーシュマニアの逃避戦略において aaMph を増殖の場として使用していることがわかってきた。

両病原体が持つ宿主免疫機構からの巧妙な回避戦略には、いくつかの共通点がある。両病原体は病原体殺傷のために最も重要な細胞であるマクロファージ細胞内において生存し、隠れることができる。またヘルパー T 細胞の免疫応答を巧みに利用して、病原体の感染・潜伏・再活性化がおこる。特に結核菌において問題なことは、マクロファージ細胞内に潜伏することにより宿主の生体防御機構から何十年も逃れて生存を続け、宿主の免疫能力が弱まったときに発症するというメカニズムである。このプロセスには病原体由来の要素とともに、病原体に潜伏感染され、のっとられた宿主側の要素も重要な役割を果たしている。しかしながら、多くのことは未だ解明されていない。

b. 具体的な研究内容・手法

(1) 動物モデル

共同研究者はこの研究に最適のユニークな遺伝子改変マウスを 2 系統持っている。

(a) マクロファージでのみ IL-4 レセプター (IL-4R \cdot) の発現が欠損したマウス (Mac-IL4R \cdot KO)

IL-4 および IL-13 の IL-4R \cdot を経た情報伝達は、別経路によって活性化されたマクロファージ (aaMph) の分化、および T 細胞の TH2 応答に必須である。よって、Mac-IL4R \cdot KO は aaMph を作らないが、TH2 応答は普通である。すなわち古典的に活性化されたマクロファージ細胞 (caMph) は存在するが、aaMph は存在しない状態での結核菌やリーシュマニア病原体の感染実験が可能である。

(b) T 細胞でのみ IL-4R \cdot の発現が欠損したマウス (T cell-IL4R \cdot KO)

マクロファージは普通であるが、TH2 応答が起きないため、リーシュマニア感染耐性となる。このマウスモデルは感染時の TH2 ヘルパー T 細胞の役割と宿主ファクターを同定するためのユニークかつ革新的な試料を提供する。

(2) 感染モデル

(a) 結核における潜伏と再活性化のモデル

エアロゾルによる結核菌投与での潜伏と再活性化のマウスモデルは Cornell らの手法を改変して行う。使用する結核菌はゲノム配列が解明されている H37RV を用いる。野生型および Mac-IL4R \cdot KO マウスを用いて、感染前、急性期、潜伏期、および薬物による再活性化期でのマクロファージ (CD11c $^+$ MHCII $^+$) をマウス肺胞から FACS フローサイトメーターを用いて分離する。

(b) リーシュマニア症の急性期モデル

ゲノム配列が決定されているリーシュマニア (*L. major* LV39) を用い、200 万の前鞭毛型 (Promastigotes) をマウス footpad に感染させる。治癒する C57BL/6 野生型マウス、治癒しない BALB/c 野生型マウス、Mac-IL4R \cdot KO マウス、T cell-IL4R \cdot KO マウスを用いる。感染 2 日経過後の各マウス排出リンパ節から、マクロファージ (CD11c $^+$ MHCII $^+$)、活性化 T 細胞 (CD4 $^+$ CD44 $^+$ CD62L low)、レギュラトリー T 細胞 (CD4 $^+$ CD25 $^+$) を FACS で分離する。

両モデルとも感染は免疫病理学的手法等によって確認

する。病原体、感染ステージ、解析対処の細胞種により、総計数十種類の感染サンプルとそのコントロールサンプルが作出される。また、3-5回の独立した実験試料の再現性は、病原体および宿主側の標的免疫細胞のマーカー遺伝子の発現プロファイルをリアルタイム RT-PCR で調べて確認する。

(3) 大規模トランスクリプトーム測定

我々は、CAGE (Capped Analysis of Gene Expression) と名づけた独自の発現解析技術を開発し、保持している。この技術は、キャップ構造を持つ転写物(RNA)の5'末端20-27塩基を用いてライブラリーを作成し、大規模にシーケンス解析する手法であり、ゲノムワイドにプロモーター活性を検出できる唯一の技術である。この技術を次世代シーケンサーに適用して、各感染サンプルあたり数百万のCAGEタグ、総計1億以上のタグを得る (deepCAGE)。疾患モデルから FACS 等を用いて分離する細胞数は 10^4 個レベルであり、得られるトータルRNAは数十 ng 程度と予想される。CAGE法は通常では ug レベルのRNAを必要とするため、我々は少量サンプル (50ng 程度) にも適用可能な、最近開発に成功した nanoCAGE法を用いる。また、必要とする場合はマイクロアレイ解析を行う。これらの測定結果は、RT-PCRを用いた確認実験を行なう。

(4) バイオインフォマティクス解析による宿主ファクター候補の選定

得られた CAGE タグのゲノム上へのマップにより、1ベースの精度でゲノム上の転写開始点を網羅的に同定できる。さらに、マップされたタグの頻度はその位置からスタートする転写物の発現量を表しており、転写物を制御する近位プロモーターの活性をも表している。多くの遺伝子は複数のプロモーター (alternative promoters) によって制御されており、その総和が遺伝子発現に反映されることから、CAGE法ではマイクロアレイから得られる遺伝子レベルの情報よりも、より分離度の高い情報が得られる。様々な解析が可能であるが、主な解析を述べる。

(a) 網羅的プロモーター解析

遺伝子単位ではなくプロモーター単位で、感染サンプルとそのコントロールサンプルとの差を解析する。alternative promoters の使われ方の相違、遺伝子以外の non-coding RNA の発現相違、センス-アンチセンス関係にあるトランスクリプトの動態変化に特に注目して解析する。

(b) 転写制御モチーフ解析

国際コンソーシアム FANTOM4 での成果 (Nature Genetics, 2009) である転写制御ネットワーク解析パイプラインを利用して、モチーフ解析 (各サンプルで、どの転写因子結合モチーフがどの程度転写制御に寄与しているかを示す解析)、差分のある遺伝子 (プロモーター) を制御している転写因子の推測をおこなう。

(c) 転写因子間相互作用サブネットワーク解析

転写因子間相互作用を調べた我々の最近の成果 (Cell, 2010) での解析を用いて、病原体感染によって影響を受けるサブネットワークを抽出し、キーとなる転写因子を同定する。

これらの解析結果と相手方の持つ病原体に関する知識を合わせて、宿主ファクター候補を選定する。

(5) 標的遺伝子候補の評価

(a) 哺乳類細胞を用いた評価

GFPが恒常的に発現するように遺伝子操作した病原体を用いてマクロファージ細胞に感染させる。候補遺伝子

についてアデノウイルスベクターを用いた強制発現、および siRNA を用いた強制的ノックダウンにより、マクロファージ細胞の病原体を殺傷する活性がどのように影響を受けるかを、GFP 蛍光の変化でモニターする。マクロファージ細胞の病原体を殺傷する活性がアップする遺伝子、感染を阻害する、あるいは病気の進行を阻害する宿主側の遺伝子を選択する。この選択では、アッセイ結果のみならず、進化上で強く保存されている遺伝子に特に注意を払う。すなわち、そのような遺伝子は選択圧に適応しており、薬物耐性を起こすことがあまり無いと考えられるからである。

(b) ヒト由来サンプルを用いた評価

薬物の標的候補遺伝子について、その発現をヒト由来サンプルを用いて評価する。すなわち、最近BCGワクチンを摂取された子供、最近始めて感染した患者、潜伏期の人、最近再活性化した患者について診療で得られたヒトサンプルを用いてマイクロアレイあるいはリアルタイム RT-PCR を用いて候補遺伝子の発現を測定する。

これらの評価実験により、候補遺伝子の感染症に対する役割が明らかとし、最終的に薬剤開発のための標的遺伝子を同定し、知財化を図る。

c. 成果目標

(1) 独自の遺伝子改変マウスを用いた感染サンプルのトランスクリプトームは、世界にまだ存在しない独創的かつ高価値のデータであり、これを生産し、論文発表する。

(2) 結核やリーシュマニア症について病原体の侵入、生存、caMph や aaMph 内での増殖に重要な役割を果たす新規の宿主側の遺伝子や情報伝達経路を同定する。

(3) 培養細胞等を用いて宿主側の遺伝子ファクターの役割を解明する。

(4) 上記で得られた成果を複数のインパクトの高い論文として発表する。

(5) 結核やリーシュマニア症に対して、薬剤の標的となりうる候補遺伝子について、特許化を図り、知的財産を確保する。

d. 我が国を中心とした科学技術コミュニティの構築と技術の普及・国際標準の創出の可能性

我々は日本を代表する次世代シーケンサーの拠点であり、独自に開発した CAGE 法と組合せた大規模トランスクリプトーム (プロモーター) 解析において、世界をリードしている。これまでの解析は正常細胞を用いたものが大半であったが、疾患サンプルへと適用を拡大することにより、我々の解析手法のさらなる世界標準化を目指している。また、我々はトランスクリプトームデータの解析のため、国際科学コンソーシアム FANTOM を主催している。アフリカ諸国からの FANTOM 会議への参加は、現在のところ南ア国だけであるが、本課題の成功により、従来希薄であったアフリカ諸国との科学技術コミュニティの拡大を実現したい。

e. 本研究の波及効果

本課題による新しい治療ターゲットの同定手法は、工夫したサンプルを用いることにより、あらゆる感染症疾患の新規治療ターゲット同定に応用可能であり、広い波及効果が見込まれる。

2. ネットワーク構築の実現可能性

当研究課題における南ア国の研究者である Frank Brombacher 教授は、我々が主催している国際科学コンソーシアム FANTOM のメンバーであり、FANTOM 活動を通じた共同研究を既に行っている。2006年に鈴木が先方を訪問

し、共同研究の具体化を話し合った。それ以降、FANTOM4会議において、Frank Brombacher 教授が来日した際にも、当共同研究に対する協議が行なわれた。その後の更なる協議により、研究プラン、研究成果の帰属、発生しうる知財に関する詳細な詰めができ、本課題が十分に練られたと判断した。

3. 本制度により取組を支援する必要性

本課題は我々が主となって、各自が得意とする独自の試料・技術を持ち寄って行なう国際共同研究である。技術の主体は、次世代シーケンサーを用いた高度なトランスクリプトーム解析であり、特殊設備を必要とするため、ODA 等による現地への技術供与にはなじみにくい。また、当研究の目的は、対象とする病原体の感染・潜伏・再活性化に関わる宿主側因子の同定とそのメカニズムの解明にあるため、産業界主導の研究開発段階ではない。創薬ターゲットとなりうる宿主因子の同定が成功した後、産業界との連携を考える。

4. 継続性

本課題により得られる、創薬ターゲットとなりうる宿主因子について、そのメカニズムをさらに詳細に解析することが必要となるために、トランスジェニックマウスの作出とそれ用いたトランスクリプトーム解析に関して、共同研究を継続する予定である。さらに、産業界を加えた創薬スクリーニングへと共同研究を発展させてゆきたいと考えている。

5. 相手国・地域との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

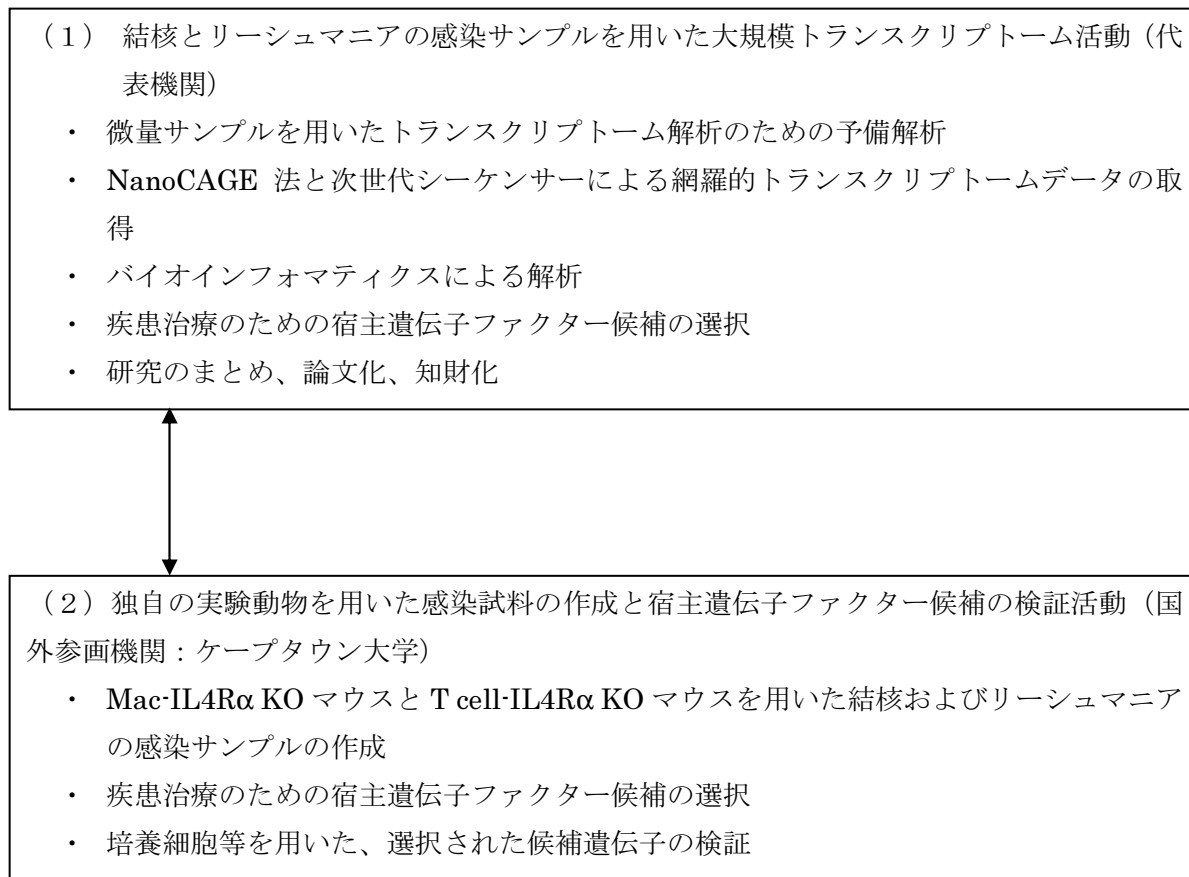
2003 年 8 月に日・南アフリカ両政府間の科学技術協力

を推進する「日・南ア科学技術協力協定」が両国の間で署名されている。参画機関であるケープタウン大学は南ア国を代表する大学のひとつであり、本課題のパートナーに相応しい。さらに、結核やリーシュマニア症は、アフリカ諸国をはじめとする発展途上国で蔓延しており、深刻な保健問題となっている。このような状況下において南アフリカ共和国政府はこれらの感染症を指定して、治療に繋がる研究の強化を切望しており、本研究計画に高い関心を示している。我が国と南ア国とは、南ア国の豊かな鉱物資源を背景とした貿易や産業に関する経済交流が主である。しかしながら、科学や文化における交流がもっと盛んとなり、バランスの取れた協力関係が創出されれば、南ア国にとって日本が真に尊敬される国家となり、政府レベルでの協力関係が、より堅固となると考えられる。当課題の終了時点で、両国が権利を持つ知財の特許化を目標とする。さらに、感染症治療に向けた新たな薬剤開発に向けて、産業振興、社会貢献へと、つないでゆきたい。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

実験研究の多くはマウスモデルを用いて行われる。感染実験は南ア国側の研究所が定めた動物実験規則・感染実験規則を遵守して適正に行われる。実験デザインを工夫して、犠牲となる実験動物の数をできる限り減らすなど、動物愛護に最大限の配慮を行なう。研究の後半において、患者由来サンプルの取得と解析が必要となる。これについては既に南ア国側では倫理基準への適合性審査を終えている。日本側においては、ヒト RNA サンプルの搬入と解析ため、独立行政法人理化学研究所倫理委員会に、研究申請を行う準備を進めている。また、遺伝子解析研究については理化学研究所の内規にのっとり、適正に研究を行なう。

7. 研究実施体制



氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎鈴木 治和	(独) 理化学研究所・プロジェクトディレクター	研究代表者
片山 睦	(独) 理化学研究所・ユニットリーダー	トランスクリプトーム解析
Carsten Daub	(独) 理化学研究所・施設長	バイオインフォマティクス
Frank Brombacher	University of Cape Town, South Africa・教授	感染症サンプルの作成と宿主因子候補の評価

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度

・ 計画

(1) 感染サンプルの作成計画

感染サンプルは共同研究側が作成するため、共同研究側と相談し、サンプルの作成計画を具体化する。

(2) 解析システムの準備

サンプルが来る前に、微量サンプルを用いたトランスクリプトーム解析のための前準備を行なう。RT-PCR, マイクロアレイ, CAGE ライブラリー作成について前準備する。

(3) サンプルの大規模トランスクリプトーム解析の開始

共同研究者側が作成し、日本に送付されるサンプルについて、順次、大規模トランスクリプトーム解析を開始する。測定したデータについて、その品質をインフォマティクス解析すると共に、諸解析をスタートする。

b. 平成 23 年度

・ 計画

(1) 大規模トランスクリプトーム解析の本格化

CAGE ライブラリーの作成と、次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析を本格化させる。現在までに世の中に存在しない、高い品質を持つ大規模なデータセットが完成予定である。また、必要なサンプルについてはマイクロアレイによるデータ生産をおこなう。得られたデータについてのインフォマティクス解析を本格化させ、必要なサンプルについては確認実験を行う。

(2) 候補遺伝子の評価

共同研究者と、検証用のサンプル作製について討議し、作成されたサンプルについて評価実験をスタートさせる。

c. 平成 24 年度

・ 計画

(1) 大規模トランスクリプトーム解析のまとめ

インフォマティクス解析レベルの品質を満たさないデータについて、取り直し等の検討を行う。

(2) 候補遺伝子の評価
 候補遺伝子の評価を本格化させ、治療標的として
 より価値の高い遺伝子を同定し、詳細解析を行う。

(3) 研究のまとめ
 3年間の研究のまとめを行う。知財・論文等の外部
 発表を行う。

9. 年次計画

研究項目	1年度目	2年度目	3年度目
感染症サンプルを用いた大規模トランスクリプトーム解析 (代表機関)	解析システムの準備 ←→	大規模解析	研究のとりまとめ ←→
	←→		
感染症サンプルの作成と宿主因子候補の評価 (ケープタウン大学)	サンプル作成 ←→	宿主因子候補の評価 ←→	まとめ実験 ←→
		←→	