

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.

補助事業課題名 : (日本語) 結核菌初回感染・再燃発症を標的とした予防法及び多剤耐性結核菌に有効な治療薬の開発に向けた研究
(英語) Studies on the prophylaxis for active or latent tuberculosis and the development of new drugs for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis.

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長 田村 敏生
所属 役職 氏名 : (英語) Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Laboratory Head, Toshiki Tamura.

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者 : 田村 敏生 (国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

課題 (1) : 成人の結核発症及び再燃発症の予防を可能とする新規リコンビナント BCG の開発及び実用化

成人の結核発症及び再燃発症を予防することを目的に、ウレアーゼ遺伝子欠損 BCG にメモリー T 細胞の分化誘導能に優れた結核菌由来の HSP70-MMP11 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG を作出し、このワクチンとしての有用性を残存する結核菌数、病理所見及びレントゲン所見を指標にモルモット、カンクイザルを用いて評価した。その結果、このリコンビナント BCG は、いずれの動物種においても対照 BCG より顕著に有効なワクチン効果を示すことを確認した。現在実用化に向け、このリコンビナント BCG の安定性の小規模検討を実施している。

課題 (2) : 潜在性結核診断法の開発

松本壮吉教授 (新潟大学大学院医歯学総合研究科) らのグループとともに、増殖期と休眠期の結核菌が産生する結核菌抗原 7 種の組換え蛋白質を調製し、それを用いて平成 29 年度以降の解析

に供する結核菌感染診断キットの原型を作成した。

課題(3)：新たな結核予防ワクチン及び追加免疫法の開発に向けた基盤研究

現行のワクチン株である BCG-Tokyo は PD1 陽性制御性 T 細胞の活性化を誘導することで、メモリー型細胞傷害性 T 細胞の分化誘導能を有している IL-17 を産生する CD4 ヘルパー T 細胞の分化を阻害している可能性を見出した。

補助事業分担者：森 茂太郎(国立感染症研究所 細菌第二部)

課題：多剤耐性結核菌に有効な新規抗結核薬のリード化合物の同定及び薬剤への実用化

本研究は結核菌由来 diadenosine tetraphosphate (MtAp₄A) を標的とした新規抗結核の開発を目的としている。FDA承認化合物ライブラリーを用いてMtAp₄Aに対する新規阻害剤のスクリーニングを行い、MtAp₄Aの活性を顕著に阻害する10種類の化合物を同定した。また本研究では、結核菌においてNAD代謝経路やエネルギー代謝に関わっているタンパク質を新規抗結核薬の標的タンパク質として選び、その機能構造相関解析を行うことも目的としている。大腸菌内で可溶性タンパク質として発現した2種類のタンパク質について精製を行い、どちらもホスホマンノムターゼ活性を示すことを明らかにした。

補助事業分担者：宮本 友司(国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

課題：結核菌の休眠状態を制御する菌体構成成分の解析

結核菌が休眠状態に移行した場合、その環境に適応するため菌体構成成分をどのように制御・変化させているかについては未だ不明な点が多い。一方、日本をはじめとして、東アジア地域に高蔓延している結核菌の北京型株は、他の型と異なり、休眠状態を制御する遺伝子群が恒常的に高発現している。そこで、この北京型株を休眠結核菌のモデルとして、菌体成分の動態解析を実施した、その結果、北京型株は、他型と比較して、解糖系や TCA cycle などに関連する一部の代謝成分が著しく減少していることが判明した。この知見は、宿主内における結核菌の休眠機構を解明する上で、重要な手がかりになり得ると考えられる。

研究開発分担者：梅村 正幸(琉球大学 熱帯生物圏研究センター)

課題：結核菌感染の病態形成における IL-17 を中心としたサイトカイン・ネットワークの解明及びそれを用いた抗結核防御応答の開発

マイコバクテリア感染肺に誘導される IL-17A 産生細胞として、TCR V γ 4⁺ および V γ 6⁺ γ δ ⁺ T 細胞が最大の集団であることを以前に報告しているが、TCR α β ⁺ T 細胞、CD3 陰性の ILC3 様細胞にも明瞭な IL-17A 産生が認められることを今回明らかにした。このうち、TCR α β ⁺ T 細胞の IL-17A 産生は、マイコバクテリア抗原刺激で増強しないことから、病原体抗原特異的 Th17 細胞ではなく、自律的に分化する Th17 細胞と推定された。IL-17A 産生細胞集団の結核菌に対する防御能を調べる目的で各遺伝子欠損マウスに結核菌を経気道感染させた際の生存率は、野生型>TCR V γ 4/6 KO>IL-17A KO の順となった。従って、TCR V γ 4/6 KO マウスに残存する非 TCR γ δ ⁺ IL-17A 産生細胞も感染防御に一定の役割を担うものと推定された。

Principal investigator : Toshiki Tamura, Ph.D., Leprosy Res. Cent, NIID.

Project 1 : Development of new recombinant(r)BCG vaccine against active or latent tuberculosis.

To develop an effective tuberculosis vaccine, we introduced the heat shock protein 70-major membrane protein II fusion gene into *ureC*-gene depleted BCG. This rBCG produced long-lasting memory-type T cells in mice. We assessed the vaccination efficacy of this rBCG by using guinea pigs and nonhuman primates. Efficacy was determined by bacterial burden in lung and spleen, histopathology score and chest X-ray image analysis. This rBCG showed better protection against *Mycobacterium(M.) tuberculosis* than control BCG in both animals.

Project 2: Development of new test for the diagnosis of asymptomatic *M. tuberculosis* infection.

We first prepared 7 recombinant proteins of *M. tuberculosis*, which are expressed in growth phase or dormant phase. Using them, we made ELISA plate to detect antibody response to each protein in order to develop new diagnostic test of the infection of *M. tuberculosis*.

Project 3 : Studies to develop new preventive and booster vaccines against tuberculosis.

We have shown that IL-17 plays an important role in the production of long-lasting memory-type cytotoxic T cells. We found that the current BCG vaccine induced the activation of the PD1-positive regulatory CD4 T cell, but did not induce the differentiation of IL-17-producing CD4 helper T cells. These results suggest that the regulatory CD4 T cells may inhibit the differentiation of IL-17-producing helper cells, and as a result BCG may not produce the long-lasting memory-type T cells efficiently.

Co-investigator : Shigetaro Mori, Ph.D., Dep. Bacteriol. II, NIID.

Project : Identification of novel anti-tuberculosis lead compounds effective for multidrug-resistant tuberculosis and having practical applicability.

We screened an FDA-approved compound library for novel inhibitors against *M. tuberculosis* diadenosine tetraphosphate (MtAp₄A), and identified ten compounds that markedly inhibit the enzymatic activity of MtAp₄A. In addition, we selected proteins involved in energy metabolism in *M. tuberculosis* as target proteins of novel anti-tuberculosis drugs. Two proteins that could be expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* were purified in order to characterize their enzymatic properties. We showed that these proteins have phosphomannomutase activity.

Co-investigator : Yuji Miyamoto, Ph.D., Leprosy Res. Cent, NIID.

Project: Characterization of cellular components from *M. tuberculosis*, which regulate the dormant state.

In dormant state, it is still unclear how *M. tuberculosis* regulates cellular components for adaptation. To clarify this point, we characterized the Beijing lineage of *M. tuberculosis*, which is known to be consistently in dormant state by constitutive upregulating the dormancy-associated genes. Comprehensive analyses of cellular components revealed that the Beijing lineage significantly decreases the metabolites belonging to glycolysis and TCA cycle, compared with those from other lineage. These findings may contribute to elucidating the mechanism of *M. tuberculosis* dormancy.

Co-investigator : Masayuki Umemura, Ph.D., Dept. Trop. Infect. Dis., Trop. Biosphere Res. Cent., Univ. Ryukyus.

Project: Elucidation of the IL-17 cytokine-network during pathological processes of tuberculosis and development of therapy against mycobacterial infection.

As we reported previously, more than half of the IL-17A-producing cells in the lung of BCG-infected mice were TCR V γ 4⁺ or V γ 6⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T cells. The remaining IL-17A-producing cells were TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells and CD3-negative ILC3-like cells. The TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells were not Ag-specific Th17 cells but so-called “naturally occurring Th17” cells. To analyze relative contribution of the TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells and TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells plus ILC3 in protective immunity, survival rates were compared between TCR V γ 4/6 KO (IL-17A-producing $\gamma\delta$ ⁺ T cell-deficient) and IL-17A KO (total IL-17A-producing cell-deficient) mice after *M. tuberculosis* infection. The order of the survival rate was wild-type > TCR V γ 4/6 KO > IL-17A KO mice. Therefore, IL-17A-producing TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells and/or ILC3 cells in TCR V γ 4/6 KO mice may play a certain role in host defense.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. TSUKAMOTO Y, MAEDA Y, TAMURA T, MUKAI T, MITARAI S, YAMAMOTO S, MAKINO M. Enhanced protective efficacy against tuberculosis provided by a recombinant urease deficient BCG expressing heat shock protein 70-major membrane protein-II having PEST sequence. Vaccine. 2016, 34, 6301-08.
2. HATANO S, TAMURA T, UMEMURA M, MATSUZAKI G, OHARA N, YOSHIKAI Y. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin expressing Ag85B-IL-7 fusion protein enhances IL-17A-producing innate $\gamma\delta$ T cells. Vaccine. 2016, 34, 2490-95.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Analysis of latent *M. tuberculosis* infection from both bacteria and host sides. 口頭, 松本壮吉, 第4回細菌学オープンセミナー, 2016/1/15, 国内.
2. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8 cytotoxic T lymphocytes. ポスター, TAMURA T, SHIMOHAKAMADA Y, UMEMURA M. 16th International Congress of Immunology, 2016/8/24, 国外(オーストラリア).
3. The role of IL-21 producing and non-producing follicular helper T cells in mycobacterial infection. ポスター, SHIMOHAKAMADA Y, TAMURA T, UMEMURA M. 16th International Congress of Immunology, 2016/8/24, 国外(オーストラリア).
4. MMP-II 抗原を使用した新規リコンビナントBCGの開発, 口頭, 塚本裕美子, 前田百美, 向井徹, 田村敏生, 宮本友司, 第1回抗酸菌研究会, 2016/9/30, 国内.
5. Development of the vaccine efficacy of recombinant BCG producing the major membrane protein-II (MMP-II) antigen., ポスター, TSUKAMOTO Y, MAEDA Y, TAMURA T, MUKAI T, MITARAI S, YAMAMOTO S, MAKINO M., Keystone Symposium(New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis), 2017/1/17, 国外(カナダ).
6. Development of the new recombinant BCG utilizing MMP-II antigen and PEST sequence., ポスター, TSUKAMOTO Y, MAEDA Y, TAMURA T, MUKAI T, MITARAI S, YAMAMOTO S, MAKINO M., 第90回日本細菌学会総会, 2017/3/19, 国内.
7. 潜在期結核菌抗原の精製と感染診断への応用, ポスター, 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, 第90回日本細菌学会総会, 2017/3/19, 国内.
8. 抗酸菌の「長生き」のメカニズムと結核対策への応用, 口頭(シンポジウム:潜在性結核感染症の診断と治療), 松本壮吉, 第92回日本結核病学会総会, 2017/3/23, 国内.
9. Diagnosis of TB infections., 口頭(Symposium:Recent advances of expected impact in TB diagnosis), MATSUMOTO S., 6th Conference of International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Asia Pacific Region, 2017/3/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Tuberculosis; Facts, Mechanisms, and Research to control it. Japan-Russia G-MedEx Project, MATSUMOTO S., International symposium of educational and scientific development-2016, 2016/9/8, 国外(ロシア).
2. 結核・抗酸菌症研究の重要性と面白さ, 松本壮吉, NOA-METS 新潟医療技術科学オープンアトリエ第7回講演会, 2016/7/22, 国内.
3. 結核(感染症対策-ワクチンを中心に-), 田村敏生, 知の市場・連携市民セミナー, 2016/11/12, 国内.

(4) 特許出願

特記事項なし

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 結核菌初回感染・再燃発症を標的とした予防法及び多剤耐性結核菌に有効な治療薬の開発に向けた研究
(英語) Studies on the prophylaxis for active or latent tuberculosis and the development of new drugs for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis.

補助事業担当者 (日本語) 細菌第二部・第四室 室長・森 茂太郎
所属 役職 氏名 : (英語) Chief, Laboratory of Tuberculosis control.
Department of Bacteriology II.
Shigetarou Mori.

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・田村敏生 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 立体構造から分かること・できること：ヌクレオチド加リン酸分解酵素の機能構造相関解析，口頭，森茂太郎，第 1 回抗酸菌研究会，2016/9/29-30，国内
2. 結核菌由来 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素の新規阻害剤と抗結核菌活性，口頭，森茂太郎，本田尚子，金玄，林原絵美子，柴山恵吾，日本農芸化学会 2017 年度大会，2017/3/18-20，国内

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（４）特許出願

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金 (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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.

補助事業課題名 : (日本語) 結核菌初回感染・再燃発症を標的とした予防法及び多剤耐性結核菌に有効な治療薬の開発に向けた研究
(英語) Studies on the prophylaxis for active or latent tuberculosis and the development of new drugs for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis.

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 主任研究官 宮本 友司
所属 役職 氏名 : (英語) Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Senior research scientist, Yuji Miyamoto

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語)
(英語)

補助事業分担者 : (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者 : 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 田村 敏生 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases.

研究開発課題名：(日本語) 結核菌初回感染・再燃発症を標的とした予防法及び多剤耐性結核菌に有効な治療薬の開発に向けた研究
(英語) Studies on the prophylaxis for active or latent tuberculosis and the development of new drugs for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis.

研究開発担当者 (日本語) 琉球大学熱帯生物圏研究センター 准教授 梅村 正幸

所属 役職 氏名：(英語) Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus,
Associate professor, Masayuki Umemura.

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 結核菌感染の病態形成における IL-17 を中心としたサイトカイン・ネットワークの解明及びそれを用いた抗結核防御応答の開発

開発課題名：(英語) Elucidation of the IL-17 cytokine-network during pathological processes of tuberculosis and development of therapy against mycobacterial infection.

研究開発分担者 (日本語) 琉球大学熱帯生物圏研究センター 准教授 梅村 正幸

所属 役職 氏名：(英語) Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus,
Associate professor, Masayuki Umemura.

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立感染症研究所ハンセン病研究センター・室長・田村敏生
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 ０件、国際誌 ３件）

1. HATANO S, TAMURA T, UMEMURA M, MATSUZAKI G, OHARA N, YOSHIKAI Y. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin expressing Ag85B-IL-7 fusion protein enhances IL-17A-producing innate $\gamma\delta$ T cells. *Vaccine*. 2016, 34, 2490-5.
2. TOYONAGA K, TORIGOE S, MOTOMURA Y, KAMICHI T, HAYASHI JM, MORITA YS, NOGUCHI N, CHUMA Y, KIYOHARA H, MATSUO K, TANAKA H, NAKAGAWA Y, SAKUMA T, OHMURAYA M, YAMAMOTO T, UMEMURA M, MATSUZAKI G, YOSHIKAI Y, YANO I, MIYAMOTO T, YAMASAKI S. C-type lectin receptor DCAR recognizes mycobacterial phosphatidyl-inositol mannosides to promote a Th1 response during infection. *Immunity*. 2016, 45, 1245-57.
3. UMEMURA M, OKAMOTO YY, YAHAGI A, TOUYAMA S, NAKAE S, IWAKURA Y, MATSUZAKI G. Involvement of IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T cells in late protective immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immun Inflamm Dis*. 2016, 4, 401-12.

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. IL-22 が誘導するホスホリパーゼ、PLA2G2A の細菌感染防御における役割，ポスター，梅村正幸，沖田大和，塩野健，矢作綾野，浜田聡，松崎吾朗，第 81 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会，長崎大学坂本キャンパス良順会館，長崎県長崎市，2016/05/13-14，国内。
2. 新規抗肺結核ワクチン戦略による早期防御免疫応答の増強効果，口頭，梅村正幸，福井雅之，中江進，岩倉洋一郎，松崎吾朗，第 86 回実験結核研究会総会，ホテル日航金沢，石川県金沢市，2016/05/25，国内。
3. マイコバクテリア感染肺に誘導される IL-17A 産生細胞集団間の機能的多様性の検討，口頭，梅村正幸，松崎吾朗，第 27 回日本生体防御学会学術総会，九州大学病院キャンパス内コラボステーション I 視聴覚ホール，福岡県福岡市，2016/07/07-09，国内。
4. 哺乳類 interleukin-22 が肝細胞に発現誘導する抗リステリア抗菌活性，口頭，松崎吾朗，沖田大和，梅村正幸，第 28 回日本比較免疫学会学術集会，東京医科歯科大学(湯島キャンパス)，東京都文京区，2016/08/18-20，国内。
5. The involvement of IL-17A and IL-17F in chronic pulmonary mycobacterial infection., ポスター，UMEMURA M, FUKUI M, TAMURA T, NAKAE S, IWAKURA Y, MATSUZAKI G. 16th International Congress of Immunology, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne Australia, 2016/08/21-26, 国外。
6. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8 cytotoxic T lymphocytes., ポスター，TAMURA T, SHIMOHAKAMADA Y, UMEMURA M. 16th International Congress of Immunology, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne Australia, 2016/08/21-26, 国外。
7. The role of IL-21 producing and nonproducing follicular helper T cells in mycobacterial

infection., ポスター, SHIMOHAKAMADA Y, TAMURA T, U MEMURA M. 16th International Congress of Immunology, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne Australia, 2016/08/21-26, 国外.

8. Functional diversity of IL-17A producing cells in the mycobacterial infected lungs., ポスター, U MEMURA M, FUKUI M, TAKAESU G, MATSUZAKI G. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2016/12/05-07. 国内.

9. Functional diversity of IL-17A-producing cells in the mycobacterial infected lungs., U MEMURA M, GIMA K, FUKUI M, TERUYA N, TAKAESU G, MATSUZAKI G. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際センター, 宮城県仙台市青葉区, 2017/03/19-21. 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし