

## 結核菌／非結核性抗酸菌に対する易感染性とIL-12/IFN- $\gamma$ 経路

楠原浩一, 高田英俊, 原 寿郎

### 【要旨】

マクロファージ内における寄生菌の殺菌を担うIL-12/IFN- $\gamma$ 経路は, 結核菌をはじめとする抗酸菌に対する免疫機構の中できわめて重要な役割を果たしている. 近年, 明らかな細胞性免疫不全のないBCG重症副反応例や非結核性抗酸菌感染症患者の中に, 本経路のサイトカイン, サイトカイン受容体, シグナル伝達物質の遺伝子変異を有する症例が存在することが明らかになってきた. この一連の免疫異常症では結核菌に対する易感染性も認められる. 本稿では, 本邦で初めて見出された常染色体優性遺伝IFN- $\gamma$ 受容体1部分欠損を中心に, IL-12/IFN- $\gamma$ 経路異常症の各病型の臨床像, 病態生理, 遺伝子解析について述べる. また, 肺結核患者を対象としてIL-12/IFN- $\gamma$ 経路の関連分子を中心とした候補遺伝子のスクリーニングを行った結果, 日本人においてIL-12受容体 $\beta$ 1遺伝子 (*IL12RB1*) の特定の多型が結核感受性や結核の重症度に関連していることが明らかになったので, その成績を併せて紹介する.

[日サ会誌 2007; 27: 9-19]

**キーワード:** インターフェロン- $\gamma$ , BCG, インターロイキン-12, 抗酸菌易感染性, 遺伝子解析

---

## The Interleukin-12/Interferon- $\gamma$ Pathway and Susceptibility to *M. Tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria

Koichi Kusuhara, Hidetoshi Takada, Toshiro Hara

### 【ABSTRACT】

The Interleukin (IL)-12/Interferon (IFN)- $\gamma$  pathway plays a pivotal role in immune defense against mycobacteria through killing of intracellular bacteria. Recently, genetic analysis of severe or recurrent cases of clinical diseases caused by weakly virulent mycobacterial species, such as BCG and nontuberculous mycobacteria, have revealed the congenital deficiencies of the molecules involved in the IL-12/IFN- $\gamma$  pathway designated as 'Mendelian susceptibility to mycobacterial disease' (MSMD). Increased susceptibility to tuberculosis has also been observed in this type of genetic disorder. In this paper, we review the clinical manifestations, pathogenesis and genetic analysis of MSMD, with special reference to partial autosomal dominant IFN- $\gamma$  receptor 1 deficiency, which we first identified in Japanese. We also refer to our gene-based association analysis of 21 candidate genes using marker single nucleotide polymorphisms, in which it is suggested that genetic variants of *IL12RB1* confer genetic susceptibility to tuberculosis, and are associated with the progression of the disease in Japanese.

[JJSOG 2007; 27: 9-19]

**keywords ;** IFN- $\gamma$ , BCG, IL-12, Susceptibility to mycobacteria, Genetic analysis

---

九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences,  
Kyushu University

著者連絡先: 楠原浩一

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1

九州大学大学院医学研究院  
成長発達医学分野 (小児科)

TEL : 092-642-5421

FAX : 092-642-5435

E-mail : [kkusuhar@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:kkusuhar@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp)

## はじめに

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、インターロイキン(IL)-12/インターフェロン(IFN)- $\gamma$ 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や環境中の非結核性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- $\gamma$ 経路のサイトカイン、サイトカイン受容体、細胞内シグナル伝達物質であるIL-12p40、IL-12受容体(IL-12R) $\beta$ 1、IFN- $\gamma$ 受容体(IFN- $\gamma$ R)1、IFN- $\gamma$ R2およびSTAT-1の各遺伝子の異常が相次いで報告されている。これら5つの分子の異常は、欠損の程度と遺伝形式の違いにより計9種に細分され、致死的な播種性BCG感染症から局所性非結核性抗酸菌感染症まで幅広い臨床スペクトラムを有している。本稿では、IL-12/IFN- $\gamma$ 経路異常の病態、臨床像、本症の遺伝子診断の抗酸菌感染症診療における有用性について述べる。また、肺結核患者を対象としてIL-12/IFN- $\gamma$ 経路の関連分子を中心とした候補遺伝子のスクリーニングを行った結果、日本人においてIL-12R $\beta$ 1遺伝子(*IL12RB1*)の特定の多型が結核感受性に関連していることが明らかになったので、その成績も併せて紹介する。

## 1. 抗酸菌に対する感染免疫

結核菌をはじめとする抗酸菌は、細胞内寄生菌であり、これらの菌に対する宿主側の免疫応答(Figure 1<sup>1)</sup>)には、マクロファージ、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、

$\gamma\delta$ T細胞などの細胞が関与している。IFN- $\gamma$ は、この中では主にCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>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。Figure 2<sup>2)</sup>に示すように、抗酸菌の侵入によりマクロファージや樹状細胞から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-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主にT細胞からIFN- $\gamma$ が分泌され、マクロファージや樹状細胞のIFN- $\gamma$ Rに結合する。その結果、これらの細胞内でSTAT-1がリン酸化されホモダイマーを形成して核内へ移行し、TNF- $\alpha$ 、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。

細胞内寄生菌に対する防御機構におけるこのIL-12/IFN- $\gamma$ 経路の重要性はノックアウトマウスの実験を通じて明らかにされているが、近年、ヒトにおいても、既知の免疫不全がなく、BCGや環境中の非結核性抗酸菌などの弱毒抗酸菌に対して選択的易感染性を示した症例において、IL-12/IFN- $\gamma$ 経路の異常が報告され、本経路がヒトの抗酸菌感染防御においても重要であることが明らかにされてきた。

## 2. IL-12/IFN- $\gamma$ 経路異常症の病態と臨床像

IL-12/IFN- $\gamma$ 経路の異常による抗酸菌易感染性は、mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) (MIM209950)と総称されており、Table 1のような臨床的特徴を有している。IFN- $\gamma$ R1、IFN- $\gamma$ R2の完全欠損ではIFN- $\gamma$ のシグナルが完全に障害され、抗酸菌感

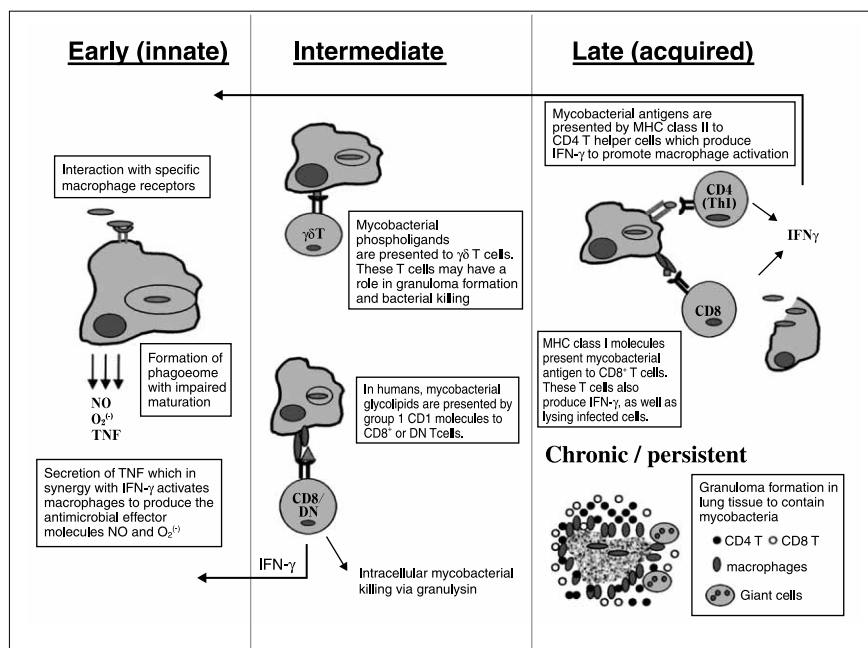
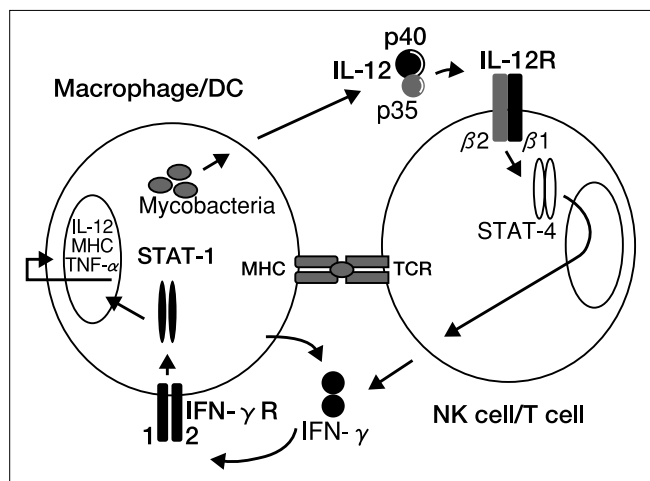


Figure 1. Host immune response to mycobacteria. Collins & Kaufmann (Immunology 2001; 103:1-9)<sup>1)</sup>



**Figure 2. IL-12/IFN- $\gamma$  pathway.**  
Modified from Dupuis et al. (Immunol Rev 2000; 178:129-137)<sup>2)</sup>

染防御機構が障害されるため、抗酸菌感染症が重症化して致死的となる。本症における抗酸菌感染症の多くは乳幼児期におこり、化学療法に抵抗性か、反応しても中止によりしばしば再発する。一方、IFN- $\gamma$  R1, IFN- $\gamma$  R2, STAT-1の部分欠損では残存するIFN- $\gamma$ のシグナルにより、またIL-12p40, IL-12R  $\beta$ 1の完全欠損ではIL-12非依存性のIFN- $\gamma$ 分泌により、感染は致死的とならず化学療法に反応性を示す。非結核性抗酸菌感染症は種々の年齢で見られる。Table 1に示すように、IL-12/IFN- $\gamma$ 経路の異常では、BCG, 非結核性抗酸菌以外の細胞内寄生菌への易感染性もみられ、約半数にサルモネラ感染症を合併している。また、リステリア感染症や結核の合併例も報告されている。以下に各異常症の概要を述べる。

**1) IL-12欠損：常染色体性劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)**

IL-12 p70は、p35とp40の2つのサブユニットからなる活性型のheterodimerで、Th0からTh1への分化を誘導しT細胞・NK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を促進することによりマクロファージを活性化し、細胞内寄生性菌に対する免疫応答を増強するサイトカインである。IL12p40完全欠損はAltareらが1998年に初めて報告した<sup>3)</sup>。本症では、*IL12B* (IL-12p40遺伝子) のhomozygousな4.4 kbpの欠失または1塩基挿入によるフレームシフトの結果、正常なIL-12p40が産生されず、抗原提示細胞からのIL-12p70 (IL-12p40とIL-12p35のヘテロダイマー) 産生が阻害される。その結果、*in vitro*では、BCGやマイトジェン刺激に対する患者末梢血単核球からのIL-12産生が認められず、IFN- $\gamma$ 産生能低下が認められる。

**臨床症状** BCG, 非結核性抗酸菌およびサルモネラに易感染性を示す。また結核やノカルジア症の報告もある<sup>4)</sup>。本症においては、次に述べるIL-12R (IL-12受容体) 欠損と同様に、生検リンパ節に成熟した類上皮肉芽腫が形成され、感染症の重症度は一般に軽度である<sup>3)</sup>。しかし、一部には感染をコントロールできず致死的となった症例も報告されている<sup>4)</sup>。

**2) IL-12R欠損：常染色体性劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)**

IL-12Rは $\beta$ 1と $\beta$ 2の2つのサブユニットからなる蛋白で、サブユニットの結合により高親和性の

**Table 1. IL-12/IFN- $\gamma$  pathway abnormalities and infections**

	Gene	Clinical features					Therapy
		BCG infection		NTM infection		Other infections	
		Severity	Granuloma	Incidence	Age at onset		
CD	AR IFN- $\gamma$ R1	Severe	(-)	(+) ( )	Early	<i>Listeria</i> <sup>#</sup> <i>Salmonella</i>	Stem Cell Transplantation
	AR IFN- $\gamma$ R2						
	AD STAT-1	Severe ?	?	?	?	Virus	
PD	AD IFN- $\gamma$ R1	Moderate	(+)	(+/-)	Over 3y	<i>Salmonella</i>	Antibiotics Anti-TB IFN- $\gamma$
	AR IFN- $\gamma$ R2	Moderate	(+)	(+/-)			
	AD STAT-1	Moderate	(+)	(+/-)			
PD	AR IFN- $\gamma$ R1	Mild	(+)	(-)		<i>Salmonella</i> <i>Legionella</i> <i>M. tuberculosis</i>	Antibiotics Anti-TB
CD	AR IL-12p40 IL-12R $\beta$ 1	Mod	(+)	(+/-)		<i>Salmonella</i> <i>M. tuberculosis</i>	Antibiotics Anti-TB

# Only complete deficiency of IFN- $\gamma$  R1, CD: complete deficiency, PD: partial deficiency, AR: autosomal recessive inheritance, AD: autosomal dominant inheritance

レセプターを形成する。IL-12R $\beta$ 1欠損では、IL-12R $\beta$ 1遺伝子 (*IL12RB1*) の点変異、欠失などのhomozygousな異常により、NK細胞やT細胞表面へのこのサブユニットの発現が阻害され、IFN- $\gamma$ 産生能低下が認められる。

本症はAltareらが1998年に初めて報告した<sup>5)</sup>。

**臨床症状** BCGやサルモネラに対して易感染性を呈するが、成熟した類上皮肉芽腫が形成され、感染症の重症度はIL-12欠損と同様、一般に軽度である。

### 3) IFN- $\gamma$ R (IFN- $\gamma$ 受容体) 1 欠損

a) 完全欠損型：常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)

IFN- $\gamma$  R 遺伝子 (*IFNGR1*) のhomozygousなあるいはcompound heterozygous (対立遺伝子のそれぞれに異なるheterozygousな変異が存在) なナンセンス変異または1塩基欠失により生ずる。本症はさらに、リガンド結合レセプターであるIFN- $\gamma$  R1の細胞表面への発現が阻害されるタイプと、IFN- $\gamma$ との結合を欠く異常レセプターの発現がみられるタイプの2型に分類される。*in vitro*では患者末梢血単核球のIFN- $\gamma$ に対する反応性がほとんど認められない。1996年、Newportら<sup>6)</sup>が家族性に抗酸菌易感染性を示す患者において、またJouanguyら<sup>7)</sup>が致死的な播種性BCG感染をおこした患者において、それぞれ本症を報告した。

**臨床症状** すべての患者が3歳以前に重症のBCGあるいは非結核性抗酸菌感染症を発症している。サルモネラやリステリアに対する易感染性もみられるほか、ウイルスに対する易感染性も一部報告されている。BCG感染巣は結核様の成熟した肉芽腫を作らない。

b) 部分欠損型：常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)

完全欠損型の軽症型であり、1997年Jouanguyらが初めて報告した<sup>8)</sup>。*IFNGR1*の細胞外ドメインをコードする領域にhomozygousなミスセンス変異が見出されている。細胞表面のレセプター発現は正常であるが、*in vitro*では、患者末梢血単核球のIFN- $\gamma$ に対する親和性が低下しており、高濃度のIFN- $\gamma$ に対してのみ反応性が見られる。完全欠損とは異なり、結核様類上皮細胞肉芽腫が形成される。

**臨床症状** 播種性BCG感染症とサルモネラ感染症を起した1例とその妹のBCG接種歴のない初感染結核を起した1例は両者とも化学療法により治癒している<sup>9)</sup>。

c) 部分欠損型：常染色体優性遺伝 (autosomal dominance inheritance, AD)

Jouanguyらが1999年に、初めて報告した<sup>9)</sup>。*IFNGR1*の膜貫通領域下流のexon6内にheterozygousな小欠失による異常があり、フレームシフトによるストップコドンを生ずる結果、5アミノ酸以下の細胞内領域しか持たないtruncated receptorを発現する。*IFNGR1*遺伝子の818番塩基周辺が変異のhot spotである。この変異レセプターはIFN- $\gamma$ と正常な親和性で結合するが、細胞内ドメインのJAK-1やSTAT-1が結合する領域を欠くため、細胞内にIFN- $\gamma$ のシグナルを伝達することができない。さらに変異レセプターはリサイクリングに関わる領域を欠いているため細胞表面に過剰に発現し、dominant negativeに作用する。残存する正常なレセプターにより、*in vitro*では患者末梢血単核球は高濃度のIFN- $\gamma$ には反応性を示す。

**臨床症状** BCG、非結核性抗酸菌に易感染性を示し、BCG感染巣は結核様の成熟した肉芽腫を形成する。重症度は完全欠損と劣性部分欠損の間である<sup>2)</sup>。

### 4) IFN- $\gamma$ R 2 欠損

a) 完全欠損型：常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)

本症では*IFNGR2* (IFN- $\gamma$  R 2 遺伝子) の細胞外ドメイン領域にhomozygousな2塩基欠失があり、細胞外ドメインでストップコドンが形成され、細胞内のIFN- $\gamma$ のシグナル伝達レセプターであるIFN- $\gamma$  R2レセプターの発現を認めない。*in vitro*では患者末梢血単核球のIFN- $\gamma$ に対する反応性が欠如し、TNF- $\alpha$ 産生やIFN- $\gamma$ シグナル伝達に必要なSTAT-1リン酸化も欠如している。IFN- $\gamma$  R1は正常である。1998年、DormanとHollandが初めて報告した<sup>10)</sup>。

**臨床症状** 重症な非結核性抗酸菌感染症が早期に起こり、多剤併用による継続的な化学療法でも著効を示さなかった小児の1例が報告されている<sup>10)</sup>。感染巣は成熟した肉芽腫を形成しない。

b) 部分欠損型：常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive inheritance, AR)

完全欠損型の軽症型であり、2001年Doffingerらが初めて報告した<sup>11)</sup>。本症では、*IFNGR2*の細胞外ドメイン領域にhomozygousなミスセンス変異を生じ、IFN- $\gamma$  R2の発現は正常であるが、*in vitro*ではIFN- $\gamma$ に対する反応性が部分的に欠如している。

**臨床症状** 小児期に播種性BCG感染症と非結核性抗酸菌*M. abscessus*による頸部蜂巣織炎およびリンパ節炎、播種性皮膚血管炎を起し、生検で成熟した肉芽腫を認め、化学療法が有効であった20

歳女子症例である<sup>11)</sup>。

### 5) STAT-1欠損 [部分欠損型：常染色体優性 (autosomal recessive inheritance, AR)]

STAT-1はIFNを介する重要なシグナル伝達物質であり、homodimer ( $\gamma$ -activating factor, GAF) またはSTAT-2/p48とのtrimer (interferon-stimulated  $\gamma$  factor 3, ISGF3) を形成する。STAT-1欠損では、*STAT1* (STAT-1遺伝子) のheterozygousなミスセンス変異 (L706S) によってIFN- $\gamma$  刺激によるSTAT-1 701番目のチロシンのリン酸化が阻害され、これがdominant negativeに働きGAF活性化が障害される結果、IFN- $\gamma$  への反応性が部分的に欠如する。2001年、Dupuisらが初めて報告した<sup>12)</sup>。

**臨床症状** 播種性BCGあるいは非結核性抗酸菌感染症を起こした2家系である<sup>11)</sup>。感染症の重症度は、IFN- $\gamma$  R1およびIFN- $\gamma$  R2の部分欠損と同様に中等症である。なお、本症における*STAT1*の変異はGAFに対してはdominantであるがISGF3に対してはrecessiveであり、ウイルスに対する易感染性は示さない。一方、*STAT1*のhomozygousな変異によるSTAT-1完全欠損が2例報告されているが、この場合はISGF3の活性化が阻害されIFN- $\alpha/\beta$ 経路も障害されるため、抗酸菌のみでなくウイルスに対しても易感染性を呈し、いずれも重症のウイルス感染症により死亡している<sup>13)</sup>。

## 3. わが国におけるBCG骨髄炎の宿主側遺伝要因としての優性IFN- $\gamma$ R1部分欠損

### 1) BCG骨髄炎

BCG骨髄炎はBCGの血行性播種による稀な骨感染症である。BCG接種後1年前後から3年で発症することが多く、日本では1960年から2000年までに14例の報告がある。ヨーロッパでは、100万のBCG接種につき、1歳未満では0.9から2.4、1歳以上では0.02-0.06の頻度と報告されている。好発部位は、四肢の長管骨である。診断は、病巣部におけるBCGの証明によるが、組織学的所見も参考となる。病巣搔爬と抗結核剤などの化学療法に反応し、予後は比較的良好であるが、骨成長が障害されることがある。

我々は本邦におけるIFN- $\gamma$ 経路異常の検索を目的としてBCG骨髄炎患者6例とその家族の解析を行った。その結果、患者3例とその父親の一人で抗酸菌易感染性を示した症例の計4例に常染色体優性の遺伝形式をとるIFN- $\gamma$  R1部分欠損を本邦で初めて見出し、本症が本邦におけるBCG骨髄炎の最も頻度の高い宿主側要因であることを報告したのでその概要を紹介する<sup>14)</sup>。

### 2) BCG骨髄炎症例の解析

対象とした6例の発症年齢は1歳4ヵ月から2歳2ヵ月で、BCG接種後5ヵ月から18ヵ月の間に発症していた。4症例が多発性であった。全例、一般的免疫能に異常をみとめず、また*in vitro*における末梢血単核球のIFN- $\gamma$  およびIL-12産生能の低下もみられなかった。

症例1~3では、患者末梢血単核球上のIFN- $\gamma$  R1の発現はコントロールと比較して、著明に上昇していた。**Figure 3**に症例1の末梢血単核球のIFN- $\gamma$  R1の発現をフローサイトメトリーの結果で示した。横軸はIFN- $\gamma$  R1の発現量 [IFN- $\gamma$  R1を認識する抗体に標識した蛍光色素 (PE) が発する蛍光の強さ]、縦軸はそれぞれの蛍光の強さを示す細胞のカウント数を示し、患者では対照と比較してIFN- $\gamma$  R1の発現が亢進していることが判る。

遺伝子解析では、*IFNGR1*の翻訳領域のシーケンス解析により、6例のうち3例に4塩基欠失がヘテロで検出され、それぞれ、811del4、818del4 (症例2、3) とした (**Figure 4**)。後者はJouanguyらの症例<sup>8)</sup>と一致しており、前者は新規の欠失であった。いずれも細胞膜貫通部位をコードする配列の下流にあたる827番から829番の同じ位置にpremature stop codonを生ずることから (**Figure 4**)、IFN- $\gamma$  R1部分欠損の確定診断を得た。症例1、2、3の家族内でこの異常を検索したところ、症例1では、抗酸菌に対して易感染性を示した父親にも同じ変異をヘテロで認め、常染色体優性の遺伝形式を確認したが、症例1、3では両親にこの変異を認めなかった。一方、*IFNGR1*の変異を認めなかった例において、*IFNGR2*、IFN- $\gamma$  遺伝子 (*IFNG*)、

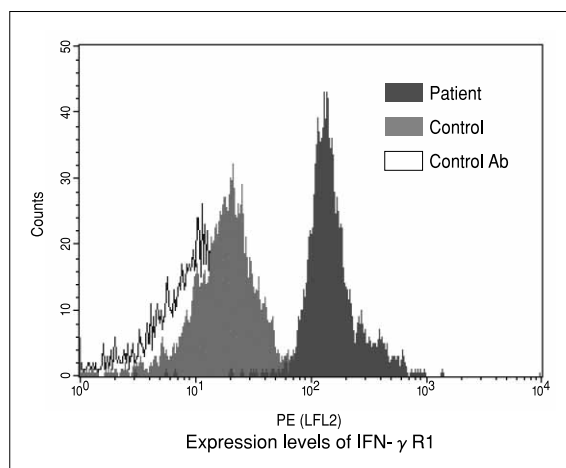


Figure 3. Expression of IFN- $\gamma$  receptor 1 (CD 14 gating).

IL12B, IL12RB1, STAT1の各遺伝子の翻訳領域のシーケンス解析を行ったが、欠失あるいは変異を認めなかった。なお、IFNGの変異と抗酸菌易感染性との関連はこれまで報告されていない。

以上の結果をTable 2にまとめた。今回見出した4例の中には抗抗酸菌治療中止後の再燃例もみられたが、最終的には治癒し比較的良好な経過であった。しかし、本症の早期遺伝子診断は、抗酸菌感染症を生じた際に最も適した治療薬を選択できること、またBCG接種を避け得ることから有益であると思われる。

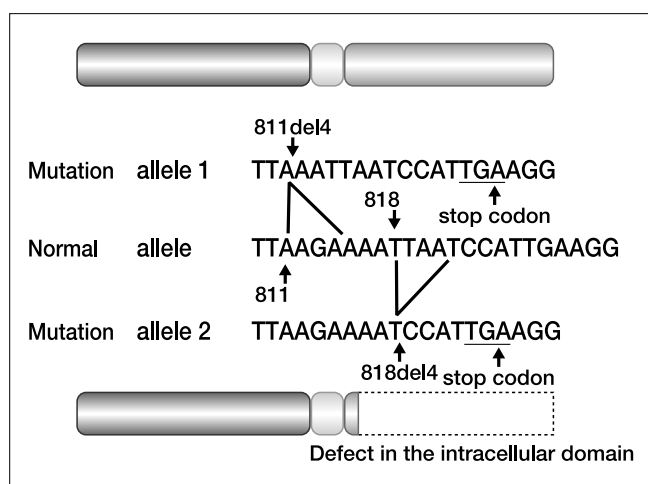


Figure 4. Mutations in the IFN- $\gamma$  receptor 1 gene identified in three of the six patients with BCG osteomyelitis.

Table 2. Summary of genetic analyses of IL-12/IFN- $\gamma$  pathway on six patients with BCG osteomyelitis

Case No.	IFNGR1	IFNGR2	IFNG IL12B IL12RB1 STAT1	Expression of IFN- $\gamma$ R1
1	811del4	Normal	ND	↑↑
2	818del4	Normal	ND	↑↑
3	818del4	Normal	ND	↑↑
4	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Normal	Normal	Normal	Normal
7*	818del4	Normal	ND	↑↑

\*Father of Case 2 with a history of TB lymphadenitis and *Mycobacterium avium* complex osteomyelitis, ND: not done

Sasaki et al (*J Infect Dis*, 2002)<sup>14</sup>

#### 4. IL-12/IFN- $\gamma$ 経路異常症の診断

BCGなどの弱毒抗酸菌による骨髄炎や全身感染症をきたした症例、治療抵抗例、再燃を繰り返す症例では、本症を疑って検索を進めてゆく必要がある。

IFN- $\gamma$  R完全欠損では血清IFN- $\gamma$ が高値を示す。IL-12p40欠損では、末梢血単核球刺激後のELISAによるIL-12p40, IL-12p70, IFN- $\gamma$ 産生が低値を示すことが診断に重要な所見である。IL-12R $\beta$ 1欠損では、患者末梢血単核球のIFN- $\gamma$ 産生が低く、フローサイトメトリーにより活性化T細胞表面上のIL-12R $\beta$ 1の発現が検出できない。患者末梢血単核球のIFN- $\gamma$ に対する反応性では、IFN- $\gamma$  R完全欠損では高濃度でも反応性がみられない。一方、IFN- $\gamma$  R部分欠損では、低濃度では反応しないが、高濃度に対しては反応を示す。また、優性IFN- $\gamma$  R1部分欠損では、フローサイトメトリーによる細胞表面IFN- $\gamma$  R1の過剰発現が診断に有用である。

以上の所見を参考にして欠損分子と欠損の程度を大まかに推定し、それに基づいて遺伝子解析を行う。確定診断は、基本的には遺伝子解析によるが、変異の種類によっては*in vitro*での遺伝子導入による機能解析が必要とされることもある。これまでに以下のような方法が報告されている。(1) lipopolysaccharide (LPS) 単独またはLPSとrecombinant IFN- $\gamma$ への反応性をTNF- $\alpha$ 産生能により評価、(2) EBウイルスによりtransformした患者B細胞(EBV-B cells)を用いてSTAT-1の核内移行をelectrophoretic mobility shift assayにより評価、(3) EBV-B cellsの細胞内のリン酸化したSTAT-1を免疫沈降法で検出。

#### 5. IL-12/IFN- $\gamma$ 経路異常症の治療と予後

同定した抗酸菌に感受性のある抗酸菌治療薬を選択することが重要である。菌の同定を待たずに治療を開始する場合には、BCG接種歴を確認し、未接種者であれば、非結核性抗酸菌感染症あるいは一部に結核を考慮する。抗抗酸菌治療が長期にわたる場合や、難治性感染部位の外科的摘出術(脾臓、腹部リンパ節など)が必要となる場合もある。本経路の異常ではBCG接種は禁忌であり、他の生ワクチン接種に際しても慎重となるべきである。

IL-12p40, IL-12R $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  R1およびIFN- $\gamma$  R2部分欠損は、通常抗抗酸菌治療が有効で、治療抵抗例ではIFN- $\gamma$ の併用が有効である。臨床症状や*in vitro*でのIFN- $\gamma$ への反応性により週3回皮下注30-50 $\mu$ g/m<sup>2</sup>から開始する。大量注射(500 $\mu$ g/m<sup>2</sup>)が必要となる場合もある。

IFN- $\gamma$  R1およびIFN- $\gamma$  R2完全欠損では抗酸菌感染症が重症で治療に抵抗性であることが多く、早期の遺伝子診断が重要である。初期には抗抗酸菌治療が有効である場合もあるが、完全治癒は稀であり、継続的な加療が必要となることが多い。IFN- $\gamma$  R1完全欠損およびIFN- $\gamma$  R2完全欠損の患者の一部では骨髄移植が行われている。

**Table 3. Association studies on marker SNPs of 21 candidate genes for TB susceptibility**

Candidate genes	Number of SNPs analyzed	Number of SNPs with MAF > 0.1	Number of marker SNPs showing $P < 0.05$			
			$2 \times 3^a$	A1+ vs A1- <sup>b</sup>	A2+ vs A2-	allele (2 $\times$ 2)
Genes with published association with TB						
<i>SLC11A1 (NRAMP1)</i>	4	3	0	0	0	0
<i>VDR</i>	12	9	0	1	0	0
<i>IL1B</i>	5	5	2	2	2	3
Genes associated with IL-12/IFN- $\gamma$ axis						
<i>IFNG</i>	2	1	0	0	0	0
<i>IFNGR1</i>	4	2	0	0	0	0
<i>IFNGR2</i>	8	7	2	0	0	0
<i>IL12A (p35)</i>	2	2	0	0	0	0
<i>IL12B (p40)</i>	3	3	0	1	0	0
<i>IL12RB1</i>	9	8	2	2	2	2
<i>IL12RB2</i>	5	5	0	0	0	0
<i>STAT1</i>	9	7	1	1	0	1
<i>IL18</i>	6	5	0	0	0	0
<i>IL18R</i>	12	11	0	0	0	0
<i>IL23A (p19)</i>	3	0	0	0	0	0
<i>IL23R</i>	4	4	0	0	0	0
<i>IL27 (EBI3, p28)</i>	3	3	0	0	0	0
<i>IL27RA (WSX-1)</i>	4	4	0	0	0	0
Genes associated with TNF- $\alpha$ pathway						
<i>TNF</i>	5	4	0	0	0	0
<i>TNFRSF1A</i>	5	5	0	0	0	0
<i>TNFRSF1B</i>	8	8	1	0	1	1
Candidate gene based on linkage analysis						
<i>UBE3A (15q11-13)</i>	5	4	0	0	0	0
Total	118	100	8	7	5	7

MAF: Minor allele frequency, <sup>a</sup>2  $\times$  3: Comparison of genotype frequencies using 2  $\times$  3 table, <sup>b</sup>A1+ vs A1-: Comparison of frequencies of genotypes with and without A1 allele using 2  $\times$  2 table

### 6. 結核の感受性・重症度と遺伝子多型

結核における宿主遺伝要因の存在は古くから指摘されている。結核菌の感染者のうち実際に結核を発症するのは10%程度であることや、identical twinにおける発症一致率がnon-identical twinよりも18~40%高いことなどはこれを支持するデータである<sup>15)</sup>。結核の宿主遺伝要因として、これまでHLAの特定のアリルや、NRAMP1、ビタミンDレセプターなどの遺伝子多型が報告されている<sup>16,17-22)</sup>。また、最近、アフリカにおいて罹患同胞対を用いたゲノム全域での連鎖解析が行われ、結核感受性locusが15q11-13とXq26に存在すると報告されている<sup>23)</sup>。

我々は、日本人において結核感受性に関連する宿主遺伝要因を明らかにするために、肺結核患者87名と正常対照265名を対象として、候補遺伝子のマーカー1塩基多型（以下SNP）を出発点とした関連解析を行った<sup>24)</sup>。

まずスクリーニングとして、21の候補遺伝子の118個のマーカーSNPについてTaqman probe法による関連解析を行った。次に、複数のマーカーSNPが結核と関連

を示した遺伝子について、そのマーカーSNPの近傍の coding SNP（以下cSNP）を検索し、アミノ酸置換を伴うcSNPについて関連解析を行った。Table 3にマーカーSNPによるスクリーニングの結果を示した。解析した候補遺伝子は、関連を示す報告が複数ある遺伝子3個、IL-12/IFN- $\gamma$ 経路関連の遺伝子14個、TNF- $\alpha$ 経路関連の遺伝子3個、連鎖解析によって最近候補に挙げられた遺伝子1個の計21個で、すべて常染色体上の遺伝子である。右端のカラムにあるように、このうち、IL-1 $\beta$ をコードする*IL1B*とIL-12R $\beta$ 1をコードする*IL12RB1*において複数のマーカーSNPが関連を示したので、これらのマーカーSNPの近傍のcSNPを検索した。

*IL1B*にはアミノ酸置換を伴うcSNPがなかったため、以下*IL12RB1*の解析を行った。Figure 5に*IL12RB1*遺伝子の構造とSNPsの位置を示し、Table 4にマーカーSNPsの関連解析結果を示した。マーカーSNPsのうち、結核との関連を示したrs2305739とrs383483の近傍にアミノ酸置換を伴うcSNPが4つあり、これらについて関連解析を行った (Table 5)。641A/Gでは、GG genotypeとGアリルは、有意に結核群で多く、genotype類

度の2×3解析でも有意差がみられた。1094T/C および 1132G/C（この2つのcSNPはTとGを入れ替えると全く同じ頻度）では、CC genotypeとCアリルは、有意に結核群で多く、genotype頻度の2×3解析でも有意差がみられた。もう一つのcSNP 1573G/Aは、genotype頻度、アリル頻度とも有意差がみられなかったのでTable 4には記載しなかったが、後述した連鎖不平衡の結果に基づいてハプロタイプ解析には含めた。Table 6は、結核患者87名をX線所見の国際分類<sup>25)</sup>にしたがって minimal, moderately advanced, far advancedの3群に分け、対照群とminimal群および対照群とadvanced群 (moderately + far) の間で*IL12RB1*の3つのcSNP (641A/G, 1094C/G, 1132C/G) との各genotypeおよびアリルの頻度を比較したものである。advanced群では、641A/G多型のGG genotypeおよびGアリル, 1094T/C または1132G/C多型のCC genotypeおよびCアリルの対照

群との頻度の差が、群分けしない場合に比較して、より顕著にみられた。

上記の4つのcSNPの連鎖不平衡解析を行なったところ、641A/G, 1094T/C, 1132C/Gはほぼ完全な連鎖

Table 4. Association studies of marker SNPs

SNP	P value (chi)		Frequency		
	2×3	2×2	A1	A2	
rs436857	0.110	0.158	Cont. TB	0.81 0.76	0.19 0.24
rs2305742	0.071	0.118	Cont. TB	0.20 0.26	0.80 0.74
rs2305739	0.008	0.037	Cont. TB	0.79 0.71	0.21 0.29
rs383483	0.033	0.011	Cont. TB	0.41 0.52	0.59 0.48
rs404733	0.092	0.054	Cont.	0.44	0.56

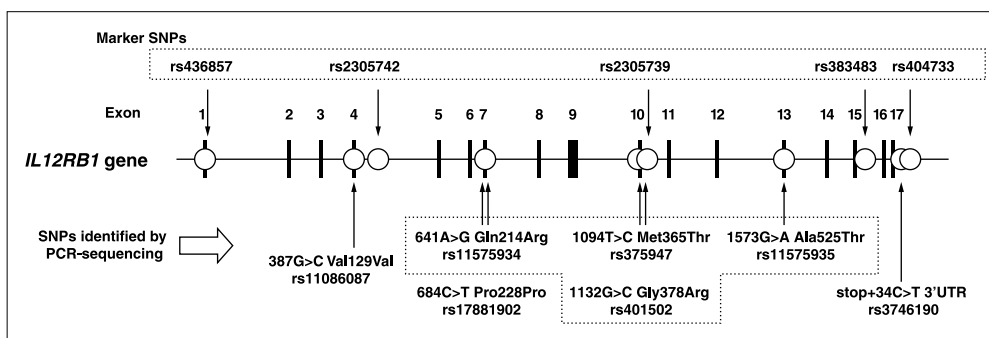


Figure 5. Structure of *IL12RB1* gene and the location of SNPs.<sup>24)</sup>

Table 5. Genotype and allele frequencies of *IL12RB1* 641A/G, 1094T/C and 1132G/C SNPs in TB patients and controls<sup>24)</sup>

<i>IL12RB1</i> cSNPs	Control	TB	OR [95% CI]	P-value
641A/G				
Genotype frequency				
AA	98 (38%)	23 (27%)		
AG	120 (47%)	41 (48%)	1.46 [0.82-2.59]	0.20
GG	37 (15%)	22 (26%)	2.53 [1.43-5.08]	0.0078
Total	255	86		(2×3: P = 0.030)
Allele frequency				
A	316 (62%)	87 (51%)		
G	194 (38%)	95 (49%)	1.59 [1.12-2.25]	0.0087
1094T/C (1132G/C)				
Genotype frequency				
TT (GG)	96 (37%)	20 (23%)		
TC (GC)	125 (48%)	44 (51%)	1.69 [0.93-3.05]	0.080
CC (CC)	39 (15%)	23 (26%)	2.83 [1.43-5.73]	0.0032
Total	263	87		(2×3: P = 0.013)
Allele frequency				
T (G)	317 (61%)	84 (48%)		
C (C)	203 (39%)	90 (52%)	1.67 [1.18-2.36]	0.0034



不平衡にあり、1573G/Aと他の3つのcSNPとの間には緩やかな連鎖不平衡がみられた。Table 7はこの4つのcSNPによるハプロタイプの推定頻度を示した。GCCGハプロタイプは、結核群で多い傾向がみられ、ATGGハプロタイプは結核群で有意に低頻度であった。

Figure 2に示した、抗酸菌に対する免疫応答におけるIL-12/IFN- $\gamma$ 経路の役割の中で、*IL12RB1*は、T細胞、NK細胞に発現するIL-12Rの $\beta$ 1 subunitをコードしている。MSMDの一つであるIL-12R欠損症では、 $\beta$ 1サブユニットの発現が低下し、T細胞、NK細胞からのIFN- $\gamma$ 産生が低下する結果、弱毒抗酸菌に対する易感染性

がみられる。一方、本症では、弱毒抗酸菌感染症の既往歴や家族歴がなく結核を発症した症例も報告されている。したがって、*IL12RB1*の遺伝子多型は結核感受性に影響する可能性が考えられる。

今回解析したcSNPと同じクラスターのSNPについては、Akahoshiら<sup>26)</sup>は日本人において結核との関連を認め、ハプロタイプの違いがIL-12Rの機能と関連することを報告している。多数の候補遺伝子のスクリーニングから得られた今回の結果は、この報告と併せ、*IL12RB1*が日本人における結核感受性遺伝子の一つであることを強く示唆している。さらに、重症度により2群に分けた検討では、本遺伝子の多型が結核の重症

**Table 6. Genotype and allele frequencies of *IL12RB1* 641A/G, 1094T/C and 1132G/C SNPs in TB patient subgroups classified by disease severity<sup>24)</sup>**

<i>IL12RB1</i> SNPs	Controls	TB Minimal	OR [95% CI]	P value	TB Advanced (Moderately +Far)	OR [95% CI]	Pc value
<b>641A/G</b>							
Genotype frequency							
AA	98 (38%)	13 (38%)			10 (19%)		
AG	120 (47%)	14 (41%)	0.88 [0.39-1.96]	0.75	27 (52%)	2.21 [1.02-4.78]	0.083
GG	37 (15%)	7 (21%)	1.43 [0.53-3.85]	0.48	15 (29%)	3.97 [1.64-9.63]	0.0028
Total	255	34			52		
Allele frequency							
A	316 (62%)	40 (59%)			47 (45%)		
G	194 (38%)	28 (41%)	1.14 [0.68-1.91]	0.62	57 (55%)	1.97 [1.29-3.02]	0.0030
<b>1094T/C (1132G/C)</b>							
Genotype frequency							
TT (GG)	96 (37%)	12 (35%)			8 (15%)		
TC (GC)	125 (48%)	15 (44%)	0.96 [0.43-2.15]	0.92	29 (55%)	2.78 [1.22-6.36]	0.025
CC (CC)	39 (15%)	7 (21%)	1.44 [0.53-3.92]	0.48	16 (30%)	4.92 [1.95-12.4]	0.00068
Total	260	34			53		
Allele frequency							
T (G)	317 (61%)	39 (57%)			45 (42%)		
C (C)	203 (39%)	29 (43%)	1.16 [0.70-1.94]	0.57	61 (58%)	2.12 [1.39-3.23]	0.00088

#International Classification of Tuberculosis (Falk A et al., 1969)<sup>25)</sup>

**Table 7. Estimated frequencies of haplotypes constituted by 4 cSNPs of *IL12RB1* in TB patients and controls<sup>24)</sup>**

Haplotype <sup>#</sup>	Frequency		chi-square	P-value
	Controls (n=249)	TB (n=86)		
ATGG	0.598	0.483	7.46	0.0063
GCCA	0.026	0.058	3.85	0.022
GCCG	0.339	0.436	5.23	0.050
others*	0.037	0.023		

SNP, single nucleotide polymorphism; TB, tuberculosis.

#Haplotypes constituted by 641A/G, 1094T/C, 1132G/C and 1573G/A

\*Haplotypes with frequencies < 0.03

度とも関連していることが明らかになった。一方、モロッコ<sup>27)</sup>と韓国<sup>28)</sup>での検討ではこの*IL12RB1*の多型のクラスターと結核との関連は認められず、また、モロッコでの検討で関連が認められたプロモーター領域のSNPは今回の解析では関連がみられなかった<sup>27)</sup>。*IL12RB1*の結核感受性への関与は民族間で異なる可能性が考えられる。

## むすび

結核菌/非結核性抗酸菌に対する易感染性とIL-12/IFN- $\gamma$ 経路について述べた。既知のIL-12/IFN- $\gamma$ 経路の異常が見出されていない抗酸菌易感染性患者における宿主側遺伝要因の解明、より強く結核感受性と関連する遺伝子多型の同定が今後の課題である。

## 共同研究者および共同研究機関

佐々木由佳, 野村明彦, 保科隆之, Saifuddin Ahmed, 高畑 靖 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野), 山本 健 (九州大学生体防御医学研究所ゲノム集団遺伝学分野), 国立病院機構福岡病院, 国立病院機構福岡東医療センター, 越谷市立病院, 県立宮崎病院, 千葉県立こども病院

## 引用文献

- 1) Collins HL, Kaufmann SH: The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001; 103:1-9.
- 2) Dupuis S, Doffinger R, Picard C, et al: Human interferon- $\gamma$ -mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev* 2000; 178:129-137.
- 3) Altare F, Lammas D, Revy P, et al: Inherited interleukin 12 deficiency in a child with Bacille Calmette-Guérin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest* 1998; 102:2035-2040.
- 4) Picard C, Fieschi C, Altare F, et al: Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 2002; 70:336-348.
- 5) Altare F, Durandy A, Lammas D, et al: Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998; 280:1432-1435.
- 6) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al: A mutation in the interferon  $\gamma$ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1941-1949.
- 7) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al: Interferon- $\gamma$ -receptor deficiency in an infant with fatal Bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1956-1961.
- 8) Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, et al: Partial interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997; 100:2658-2664.
- 9) Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, et al: A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999; 21:370-378.
- 10) Dorman SE, Holland SM: Mutation in the signal-transducing chain of the interferon- $\gamma$  receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 1998; 101:2364-2369.
- 11) Doffinger R, Jouanguy E, Dupuis S, et al: Partial interferon- $\gamma$  receptor signaling chain deficiency in a patient with Bacille Calmette-Guérin and Mycobacterium abscessus infection. *J Infect Dis* 2000; 181:379-384.
- 12) Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, et al: Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 2001; 293:300-303.
- 13) Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, et al: Impaired response to interferon-alpha/ $\gamma$  and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 2003; 33:388-391.
- 14) Sasaki Y, Nomura A, Kusuhara K, et al: Genetic basis of patients with bacille Calmette-Guérin osteomyelitis in Japan: identification of dominant partial interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency as a predominant type. *J Infect Dis* 2002; 185:706-709.
- 15) Comstock GW: Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:621-624.
- 16) Singh SP, Mehra NK, Dingley HB: Human leukocyte antigen (HLA)-linked control of susceptibility to pulmonary tuberculosis and association with HLA-DR types. *J Infect Dis* 1983; 148:676-681.
- 17) Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al: Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318:727-732.
- 18) Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al: Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998; 338:640-644.
- 19) Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, et al: Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* 1998; 279:226-228.
- 20) Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, et al: Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999; 179:721-724.
- 21) Wilkinson RJ, Patel P, Llewelyn M, et al: Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 $\gamma$  on tuberculosis. *J Exp Med* 1999; 189:1863-1874.

- 22) Greenwood CM, Fujiwara TM, Boothroyd LJ, et al: Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 405-416.
- 23) Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, et al: Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8005-8009.
- 24) Kusuvara K, Yamamoto K, Okada K, et al: 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.* 2007; 34:35-44.
- 25) Falk A, O'Connor JB, Pratt C: Classification of pulmonary tuberculosis. In: Diagnostic standards and classification of tuberculosis. National Tuberculosis and Respiratory Disease Association, New York, 1969; 68-76.
- 26) Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, et al: Influence of interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 polymorphism on tuberculosis. *Hum Genet* 2003; 112:237-243.
- 27) Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C, et al: Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J Infect Dis* 2004; 190:580-587.
- 28) Lee HW, Lee HS, Kim DK, et al: Lack of an association between interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 polymorphism and tuberculosis in Koreans. *Respiration* 2005; 72:365-268.

