

結核の発病予測と効率的な患者発見のための全血液 mRNA マーカーの研究開発

結核研究所

生体防御部長 土方 美奈子

世界の結核罹患率の減少を加速するためには革新的な新技術の導入が必要であり、その研究開発に向けて2014年にWHOが出した「新しい結核診断検査の目標とする製品性能(target product profile, TPP)」には、(1)非喀痰バイオマーカーを用いたポイント・オブ・ケア検査(Point-of-Care Testing, POCT)、(2)確定診断のためにさらに結核検査を必要とする人のトリアージのためのPOCT、(3)スミア法に代わる喀痰POCT、(4)迅速な薬剤耐性検査の4項目が記載された¹。結核菌に感染したヒトの多くは免疫によって結核菌を体内に封じ込めて潜在性結核感染症(LTBI)の状態となるが、世界の人口の25%がLTBIで、その5-10%が生涯のいずれかの時点で活動性結核を発病すると推計されている。活動性結核発症リスクの高いLTBIを見分けて治療して発病を抑制すること、プライマリーケアレベルで効率的な結核患者発見を行うことは、結核のさらなる伝播を断ち切り罹患率を下げるために重要な、グローバルヘルス上の焦点の一つである。

LTBIでは、体内に封じ込められている結核菌の存在を直接的に検出することは困難で、インターフェロン γ 遊離試験(IGRA)によって結核菌に対する宿主免疫応答を検出することにより間接的にLTBI診断が行われているが、IGRAの値の高低を結核発病予測や活動性結核診断に用いることはTPPに合致せず、有効な方法ではない。2010年に結核患者の全血液中のメッセンジャーRNA(mRNA)発現に特徴的なパターンがあることが報告された後²、(1)(2)の目標性能を目指し、採取が容易な全血液を材料として、採血時にRNA保存液の入った採血管を用い、結核の病態を反映する宿主mRNAバイオマーカーの研究開発が世界的に盛んに行われており、その背景には、2008年頃から急激な発展を遂げた次世代シーケンサーの存在とデータ解析技術の進歩がある。

全血液 mRNA バイオマーカーによる結核発病予測

RNAには様々な種類があるうち、mRNAは細胞の中でタンパク質の設計図のように働き、ヒトゲノム上

のタンパク質をコードする約2万個の遺伝子から転写されたmRNA量の解析は、それぞれがタンパク質をコードするので機能や相互作用がわかりやすいこと、mRNAの末端にあるポリA配列により解析対象のRNA分子を選択する手法が容易で安定していること、必要なデータ量が比較的少ないこと、などの理由で、次世代シーケンサーを用いたRNA発現解析の中では初期から多用されてきている。特に2016年にZakらによって報告された南アフリカを中心とするコホート研究は代表的なもので、合計10,829人の研究参加者を2年間フォローアップして119人の活動性結核発病者を得た大規模研究である³。Zakらは、コホート内症例対照の形で結核発病者とLTBIであるが発病しなかった対照者を厳選し、経時的に得られた全血液検体から次世代シーケンサーによるmRNA網羅発現解析を実施し、機械学習も用いて16遺伝子のmRNA発現量から発病リスクスコア計算するバイオマーカーを提唱した。Zakらの報告以外にも、小規模に活動性結核と健常者の比較を行ったもの等も含め様々な研究から抽出された、結核における全血液mRNA発現パターンの特徴は、インターフェロン γ のみならず、I型インターフェロン(α , β)によって発現誘導される遺伝子の中核をなすことにあり、バイオマーカーとして提唱された宿主遺伝子は、1遺伝子~50以上の遺伝子の組み合わせまで幅広い⁴。

全血液11遺伝子発現パターンによる結核発病リスク判定とLTBI治療の試み

上記Zakらの16遺伝子は、その後の検討で11遺伝子に絞り込まれ、全血を材料としたリアルタイムRT-PCRで得られる11遺伝子発現量によるスコア計算・結核発病リスク評価系(RISK11)が作成された。Scribaらは、このRISK11を用い、南アフリカでランダム化比較試験(RCT)を行い、結果を報告した⁵。2年間の登録期間で、約1万5千人の健康な成人(HIV陰性、過去3年間は結核の既往無)のうち、9.3%がRISK11陽性と判定された。約3,000人がRCTの対

象となり、RISK11陽性で3か月のイソニアジド・リファペンチン（3HP）治療あり（375名、IGRA陽性66.7%）、RISK11陽性で治療なし（764名、同69.1%）、RISK11陰性で治療なし（1,784名、同62.6%）の3群が15か月間結核発病の有無のチェックを受けたのに加え、RISK11のバイオマーカーとしての評価も行われた。研究参加時にRISK11陽性者の4.1%が活動性結核（そのうち83.6%が無症状）と診断されたのに対し、RISK11陰性者では0.78%で、RISK11は結核発見トリアージにある程度有用である可能性が示された。また、RISK11による結核発病の予測は6か月～1年の期間に限定すれば有用であった。しかしながら、最も注目を集めたRISK11陽性者への3HP治療は、RISK11陽性で治療あり群から6名の発病者が見られ、治療を行わなかった群と比較して有意な発病阻止効果がみられなかった。南アフリカの高蔓延な状況で3HPが発病阻止に十分だったのか、3HP終了後の再感染・発病の可能性など、結果の解釈には新たな問題が提示された。

結核の治療結果予測と全血液 mRNA マーカー

WHOのTPP1では、結核発病の2年前からの予測が可能であることが期待されているが、実際に今まで得られた様々な遺伝子の組み合わせによるバイオマーカーは、WHOの求める感度・特異度の基準を用いれば、それより短い期間でしか予測できなかった^{3,4,5}。これらのmRNAの発現パターンは、結核発病前から発病に向かい、次第に明確なものに増強していく一方

で、結核治療の過程では、逆に次第に健常状態に復していき、いわば鏡面对称の関係にあることが南アフリカの研究で示された⁶。また、同じ報告の中で、結核治療結果の予測に有用である新たな5遺伝子の組み合わせも提唱された。最近、ヨーロッパの研究グループも、独自の22遺伝子発現量スコアを用い、ドイツ・ルーマニアの結核患者で結核治療結果の予測の可能性を示している⁷。

今後の展開

全血RNAマーカー開発にはPOCTを目指した検査法の簡便化、コストダウンなどの課題もあるが、網羅RNA発現解析の技術は、年々新しいものが導入されつつあり、タンパク質はコードしないが遺伝子発現調節など様々な機能を有する非コードRNAの解析、第3世代シークエンサーとも言われる長鎖シークエンサーを用いた全長mRNAの解析などにより、今後も幅広く研究が続けられ、さらに新しい知見が得られることが期待される。

参考文献:

- 1 WHO. https://www.who.int/tb/publications/tpp_report/en (accessed May 08, 2021) .
- 2 Berry MP, *et al.* Nature 466: 973-7, 2010.
- 3 Zak DE, *et al.* Lancet 387: 2312-2322, 2016.
- 4 Gupta RK, *et al.* Lancet Respir Med 8:395-406, 2020.
- 5 Scriba TJ, *et al.* Lancet Infect Dis 21: 354-365, 2021.
- 6 Thompson EG, *et al.* Tuberculosis 107:48-58, 2017.
- 7 Heyckendorf J, *et al.* Eur Respir J. 2021 Feb 11:2003492 (Early View) .

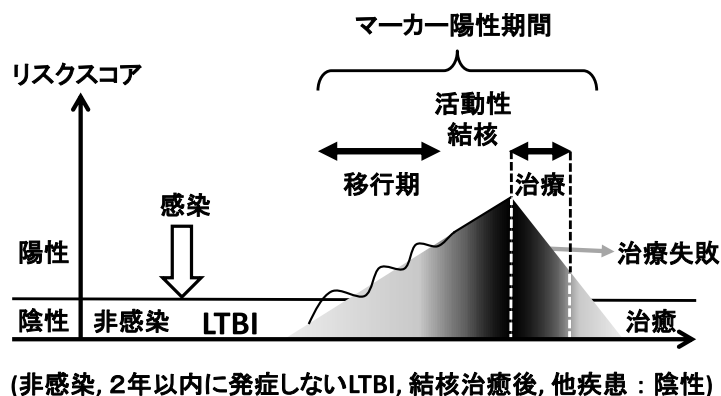


図 結核の病態を反映する全血液 mRNA バイオマーカーのイメージ