

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：18K15917
研究課題名(和文)肺非結核性抗酸菌症におけるコレステロール合成活性化機構の解明とその治療への応用
研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of cholesterol synthesis activation in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease and its application to treatment
研究代表者
松山 政史(Matsuyama, Masashi)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：30816111
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：M. avium感染がマウスの肺組織におよぼす影響を探索するために、M. avium感染2カ月後の野生型マウス肺組織で、RNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、TLRシグナルの活性に加えて、Th1、Th17免疫、PD-1経路、Nrf2経路の重要性が明らかになった。
また、抗酸化ストレス因子であるNrf2遺伝子の欠損マウスにM. aviumを感染させる実験を実施し、Nrf2はHO-1とNramp1を制御することでM. avium感染に対して防衛的に働くことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、M. avium感染2カ月後の野生型マウス肺組織で、RNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、TLRシグナル、Th1/Th17免疫、PD-1経路、Nrf2経路などの重要な遺伝子発現経路が明らかになった。この情報は、今後の抗酸菌研究の重要なライブラリーになる可能性が高く、社会的意義は大きい。さらに、Nrf2がM. avium感染に重要であることが明らかになり、今後の新規治療方法を考慮するのに重要な報告となった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of M. avium infection on the lung tissues of mice, comprehensive gene expression analysis by RNA-seq was performed on wild-type lung tissues 2 months after M. avium infection. In addition to the activity of TLR signals, the importance of Th1/Th17 immunity, PD-1 pathway, and Nrf2 pathway was shown in this infected wild-type mice model by RNA-seq analysis.

Moreover, an experiment was conducted in which mice lacking the Nrf2 gene, which is a redox-sensitive transcription factor that regulates the expression of antioxidant and detoxification genes, were infected with M. avium. Then, this experiment discovered that Nrf2 protects against M. avium infection by regulating HO-1 and Nramp1.

研究分野：肺非結核性抗酸菌症

キーワード：RNA-seq 遺伝子発現解析 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで遺伝子改変マウスを使用し肺非結核性 (NTM) 感染マウスモデルを作成、肺 NTM 症における宿主因子が及ぼす影響の研究を行ってきた。また、申請者が留学中に行った研究では、3D 培養した NTM 感染ヒト気道上皮に対し網羅的遺伝子発現解析を実施、気道上皮において線毛機能、炎症・免疫反応経路 (IL-32、Toll like receptor (TLR) シグナリング) などが NTM 感染時に重要な役割を果たしていること、さらにコレステロール合成経路が NTM 感染ヒト気道上皮で活性化されていることを世界で初めて見出した。

コレステロール合成経路の活性化と感染症との関係については十分な報告がない一方で、コレステロールは結核菌が細胞内にとりこまれ生存するために重要な役割を果たすことが報告されており、NTM または抗酸菌感染時の特異的な反応とも考えられる。また、TLR シグナリング経路の活性化を介して、コレステロール合成経路が活性化されることが報告されているが、NTM 感染におけるコレステロールの役割は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

こうした背景を踏まえ、野生型マウスに経気道的に *M. avium* を感染させ、*M. avium* 感染が TLR シグナル、コレステロール合成経路に及ぼす影響を検証してみることにした。

3. 研究の方法

NTM として肺 NTM 症患者臨床分離株 *Mycobacterium. avium* subsp. *hominissuis* を実験に用いた。野生型マウスに複数量の NTM を経気道的に感染させ感染 2 カ月後に肺病理所見、主要臓器の菌量、気管支肺胞洗浄液を評価し、さらに感染 2 カ月後の肺組織で RNA-seq による遺伝子発現の網羅解析を実施した。その結果、TLR シグナルの活性に加えて、Th1、Th17 免疫、PD-1 経路、Nrf2 経路の重要性が明らかになった。ヒトの気道上皮で確認されたコレステロール合成経路は感染マウス肺組織では確認されなかった。

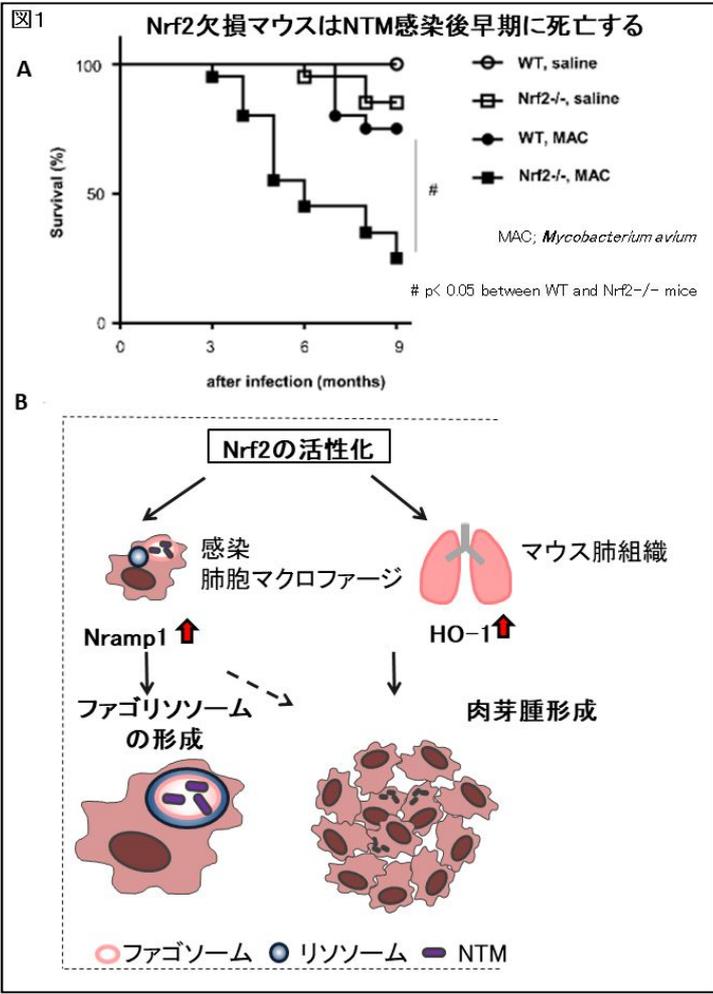
そこで、抗酸化ストレス因子である Nrf2 遺伝子の欠損マウスに *M. avium* を感染させる実験を実施し、マウス肺における *M. avium* 感染における Nrf2 の役割を明らかにすることにした。野生型マウスと Nrf2 遺伝子欠損マウスに複数量の NTM を経気道的に感染させ、感染 2 カ月後、4 カ月後、8 カ月後に表現型 (肺病理所見、主要臓器の菌量、気管支肺胞洗浄液) の違いを確認した。また生存率を確認し、感染 2 カ月後には、フローサイトメトリー、酸化ストレスレベル、RNA-seq 解析などを実施し、感染野生型マウスと感染 Nrf2 遺伝子欠損マウスの違いを確認した。また、感染 2 カ月後の肺胞洗浄液からマクロファージを採取し、感染肺胞マクロファージで、Nrf2 の活性化の違いについて、Nrf2 の核内移行の程度をウエスタンブロットで確認した。さらに、Nrf2 を活性化するスルフォラファンを野生型マウスに投与し、主要臓器における菌量の減少に寄与するかを評価した。

4. 研究成果

M. avium 感染が TLR シグナル、コレステロール合成経路に及ぼす影響を検証するために、まず、野生型マウスに経気道的に *M. avium* を感染させ、どのような宿主応答が感染肺に生じるのか網羅的に探索してみた。野生型マウスに経気道的に *M. avium* を感染させた感染肺組織 (感染 2 カ月後) において、遺伝子発現の網羅解析を RNA-seq で実施した。その結果、肺 MAC 感染モデルにおける重要な遺伝子群、遺伝子経路を明らかにすることができた。

具体的には TLR シグナルの活性に加えて、Th1/Th17 免疫、PD-1 経路、Nrf2 経路の活性化が亢進しており、これらの経路の重要性が明らかになった。これらの、感染マウス肺組織における、宿主応答としての遺伝子発現の変化は、今後、抗酸菌研究者にとって、大変貴重なライブラリーになることが推測された。

残念ながら、ヒトの気道上皮で確認されたコレステロール合成経路は感染マウス肺組織では確認されなかった。そこで、この感染マウス肺における遺伝子発現の網羅解析結果を踏まえ、抗酸化ストレス因子である Nrf2 遺伝子欠損マウスに *M. avium* を感染させる実験を実施し、マウス肺における *M. avium* 感染における Nrf2 の役割を明らかにし、論文として報告した (mBio. 2021; 12: e01947-20.)。Nrf2 は NTM に対して防御的に働くことが明らかになった (図 1A)。具体的には Nrf2-Nramp1 経路と Nrf2-HO-1 経路の活性化が NTM の感染防御に重要であることを示した (図 1B)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kawaguchi Mio, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma, Yazaki Kai, Osawa Hajime, Muratani Masafumi, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Nrf2 Regulates Granuloma Formation and Macrophage Activation during Mycobacterium avium Infection via Mediating Nramp1 and H0-1 Expressions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01947-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01947-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 1. 松山政史、中嶋真之、野中水、荒井直樹、松村聡介、酒井千緒、石井幸雄、齋藤武文、檜澤伸之	4. 巻 38
2. 論文標題 非結核性抗酸菌症のHost因子とHost-directed therapyの可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 456-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松山政史	4. 巻 35
2. 論文標題 非結核性抗酸菌症 各論 3 肺非結核性抗酸菌症のホスト側因子	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vita	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村聡介、中嶋真之、松山政史、酒井千緒、矢崎海、吉田和史、際本拓未、松野洋輔、森島祐子、石井幸雄、檜澤伸之
2. 発表標題 RNA-seqによる遺伝子発現解析に基づいた、Mycobacterium avium感染後の宿主免疫応答の評価
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会 2021年4月
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 肺NTM症の病態. 第61回日本呼吸器学会学術講演会 共同企画 シンポジウム「結核・非結核性抗酸菌症の現状と最新知見」
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会 2021年4月(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 肺NTM症治療におけるhost-directed therapyの可能性. 第95回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会 シンポジウム1「非結核性抗酸菌症治療のカッティングエッジ」
3. 学会等名 第95回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋真之、松山政史、川口未央、Mingma Sherpa、大澤翔、矢崎海、吉田和史、塩澤利博、中澤健介、増子裕典、小川良子、際本拓未、松野洋輔、森島祐子、坂本透、石井幸雄、檜澤伸之
2. 発表標題 マウスを用いた肺MAC感染モデルにおけるNrf2の役割
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋真之、松山政史、石井幸雄、檜澤伸之
2. 発表標題 抗酸化ストレス因子Nrf2はNRAMP1を誘導しMACの疾患感受性を制御する.
3. 学会等名 第50回結核・非定型抗酸菌症治療研究会, 2019年12月(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋真之、松山政史、石井幸雄、檜澤伸之
2. 発表標題 抗酸化ストレス因子Nrf2が肺MAC感染に与える影響について.
3. 学会等名 第4回抗酸菌研究会, 2019年11月(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山政史、中嶋真之、檜澤伸之
2. 発表標題 非結核性抗酸菌症の気道防御.
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会 シンポジウム「非結核性抗酸菌症研究の新たな潮流」,2019年10月18日(仙台)(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Matsuyama
2. 発表標題 Host factors in pulmonary nontuberculous mycobacterial (PNTM) disease - Transcriptome analysis in PNTM infection
3. 学会等名 2018 JRS (Osaka) international symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 非結核性抗酸菌と宿主応答について
3. 学会等名 第3回抗酸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 宿主要因から考える肺非結核性抗酸菌症の病態メカニズム
3. 学会等名 第25回新潟抗酸菌・気道感染研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 宿主要因から考える肺非結核性抗酸菌症の謎
3. 学会等名 第49回結核・非定型抗酸菌症治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中嶋真之、松山政史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 13-18
3. 書名 トピック「次世代の診療につながる最新知見」、渡辺彰、菊地利明編集、非結核性抗酸菌症 マネジメント 咳と痰をどう診るか？リアルワールドでのコツと工夫	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------