

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15966

研究課題名(和文) 肺MAC症における未解明クラリスロマイシン耐性化因子の同定と新規薬剤の有効性評価

研究課題名(英文) Identification of an unidentified clarithromycin resistance mechanism in pulmonary MAC disease and evaluation of the efficacy of novel agents.

研究代表者

深野 華子 (Fukano, Hanako)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官

研究者番号：40807541

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)：日本国内の結核患者数の減少に相反し、非結核性抗酸菌(NTM)症の患者数は著しい増加傾向にあり、患者数が14万人を超える新興感染症である。2014年の肺NTM症新患数が結核患者とほぼ同数の19,000人であることが報告されており、今後も患者の増加が見込まれる。肺NTM症の約9割を占める肺MAC症の治療にはクラリスロマイシンをキードラッグとした多剤併用療法が実施されるが、治療途中の耐性菌出現により根治は極めて困難となる。マクロライド耐性化因子の研究では、23S rRNA遺伝子上における点突然変異が理解されているが、本研究において同遺伝子上に変異を持たないCAM耐性株の存在を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺NTM症の約9割を占める肺MAC症の治療にはクラリスロマイシン(CAM)をキードラッグとした多剤併用療法が実施されるが、治療途中のCAM耐性菌出現により根治は極めて困難となり、CAM耐性肺MAC症患者の予後が多剤耐性結核患者と同等に悪い。他属菌におけるマクロライド耐性化因子の研究では、23S rRNA遺伝子上のドメイン における点突然変異のほかに膜透過性の変化や多剤排出トランスポーターの活性化等が理解されているが、NTMにおいては同遺伝子上の点突然変異のみしか理解されていない。また、CAM耐性化肺MAC症の予後が非常に悪いことからCAMに代わる新規抗菌化合物の開発が待たれている。

研究成果の概要(英文)：In contrast to the decrease in the number of TB patients in Japan, the number of patients with non-tuberculous Mycobacterium tuberculosis (NTM) disease has been increasing markedly and is an emerging infectious disease with more than 140,000 patients. 19,000 new cases of pulmonary NTM disease were reported in 2014, almost the same number as TB patients, and the number of patients is expected to continue increasing. Pulmonary MAC, which accounts for about 90% of pulmonary NTMs, is treated with multidrug combination therapy using clarithromycin as the key drug, but the emergence of resistant strains during the course of treatment makes radical cure extremely difficult. Although point mutations in the 23S rRNA gene are understood to be the cause of macrolide resistance, in this study, we found the existence of CAM-resistant strains that do not have mutations in the 23S rRNA gene.

研究分野：微生物学

キーワード：非結核性抗酸菌症 薬剤耐性 新規抗菌薬開発

1. 研究開始当初の背景

日本国内の結核患者数の減少に相反し、非結核性抗酸菌 (NTM) 症の患者数は著しい増加傾向にあり、患者数が 14 万人を超える新興感染症である。2014 年の肺 NTM 症新患数が結核患者とほぼ同数の 19,000 人であることを報告されており、今後も患者の増加が見込まれている。

肺 NTM 症の約 9 割を占める肺 MAC (*Mycobacterium avium* complex) 症の治療にはクラリスロマイシン (CAM) やアジスロマイシン (AZM) などのマクロライドをキードラッグとした多剤併用療法が実施されるが、治療途中のマクロライド耐性菌出現により根治は極めて困難となり、マクロライド耐性肺 MAC 症患者の予後が多剤耐性結核患者と同等に悪いことが報告されている。

他属菌におけるマクロライド耐性化因子の研究では、23S rRNA 遺伝子上のドメインにおける点突然変異のほかに膜透過性の変化や多剤排出トランスポーターの活性化等が理解されているが、NTM においては 23S rRNA 遺伝子上の点突然変異のみしか理解されていない。

また、マクロライド耐性化肺 MAC 症の予後が非常に悪いことからこれらに代わる新規抗菌化合物の開発が待たれているが、新規抗菌薬開発は未だ進んでいないため、新規抗結核薬の肺 MAC 症への応用が検討課題となっている。

2. 研究の目的

日本における Hirama ら (2016) の報告では *M. avium* 10 菌株中 2 菌株 (20%)、*M. intracellulare* 2 菌株中 1 菌株 (50%) で、韓国における Moon ら (2016) の報告では *M. avium* と *M. intracellulare* を区別しない MAC 28 菌株中 1 菌株 (4%) でマクロライド耐性にもかかわらず 23S rRNA 遺伝子上の点突然変異を認めないという結果が示されているが、これについて詳細なゲノム解析はなされていない。本研究においては、既知の耐性機構では説明のつかない未解明マクロライド耐性機構保有 MAC 株の存在比率を把握するとともに、それらの株の遺伝的特性・作用機序探索を目的とした。更には、本研究において、新規抗菌薬開発・抗菌薬併用療法最適化のためチオペプチド化合物誘導体の効果評価、また、ベダキリンと種々の抗抗酸菌薬との併用効果について評価した。

3. 研究の方法

国内の協力医療研究機関から提供された 209 株についてショートリードシーケンサーによる次世代シーケンス解析を実施した。また、それらの菌株を使用し、2 種のマクロライド (クラリスロマイシン・アジスロマイシン) に対する薬剤感受性試験を実施しマクロライド耐性株 (MIC > 32 µg/mL) を抽出した。また、マクロライド耐性であると確認された菌株については 23S rRNA 遺伝子における既知のミューテーション部位ならびに 23S rRNA 全長配列についてミューテーションを確認した。

また、マクロライド耐性にも関わらず 23S rRNA に変異がない株に関しては、共通の変異スポットの有無を確認するとともに、系統的な偏りの有無を Core genome SNP による系統解析により確認した。更には、国内の協力医療研究機関から提供されたマクロライド感受性株 49 株を長期間人為的に低濃度のクラリスロマイシン添加下にて長期培養することにより耐性誘導化を行い、それらの株における変異を確認した。

また、本研究では *Nocardia pseudobrasiliensis* の骨格ペプチド内のアミノ酸置換によりチオペプチド化合物の誘導体作成を行い、培養菌体抽出物を回収し、*M. avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium abscessus* に対する抗菌活性評価を実施した。共同研究者から提供された *N. pseudobrasiliensis* の複数の組換え体由来培養液を用いて、微量液体希釈法を用いてバイオアッセイを行った。更には、新規抗結核薬と抗抗酸菌薬との併用効果の有無をチェッカーボードアッセイにより評価した。

4. 研究成果

国内の協力医療研究機関 3 施設から提供された 209 株をクローニングし、薬剤感受性試験によってそのうち 97 株が耐性株であることを確認した。シーケンスの結果、これらのうち 6 株 (6.2%) が既知の 23S rRNA 遺伝子の点突然変異を認めない株であった。23S rRNA 遺伝子の全長の変異について確認したが、特異的な配列・変異等は認められなかった。また、SNP 解析によってそれら 6 株の共通変異を探索したが、株間の SNP 数が数万 SNP を超えており、共通変異を見出すことはできなかった。また、これらの株について耐性前の株の検索も実施したが、耐性前の感受性株はクローンが異なっていたため変異の特定には至らなかった。また、これらについて、Core genome SNP に基づく系統解析を行ったところ 2 例は East Asia 2 の Lineage に属していることを確認した。

また、人為的誘導による耐性化株については全ての株において 23S rRNA 遺伝子の既知の

部位に変異が入っており、未解明株は出現しなかった。

放線菌 *Nocardia pseudobrasiliensis* 組換え株から新規に合成・同定されたチオペプチド化合物 Nocarditiocin 誘導体を用いて効果評価を実施したところ、組換え前の野生型株と比較して8倍の抗菌効果を示す組換え株を得ることができた。これらは、*M. avium* だけでなく *M. abscessus*, *M. smegmatis* にも抗菌効果を発揮しており、NTM に大して広く抗菌活性を示す物質であることが示唆されている。

また、新規抗結核薬であるベダキリンと既に抗抗酸菌薬として臨床で使用されている薬剤を用いて併用効果試験を実施した。その結果、ベダキリンとクロファジミン、ベダキリンとアミカシンの併用時に相乗的な効果が得られることが示された。

本研究課題により、マクロライド耐性機構の更なる研究発展の必要が明らかとなった。今後、RNA-seq 等により耐性機構解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Mitsunori, Sano Sotaro, Chien Jung-Yien, Fukano Hanako, Suzuki Masato, Asakura Takanori, Morimoto Kozo, Murase Yoshiro, Miyamoto Shigehiko, Kurashima Atsuyuki, Hasegawa Naoki, Hsueh Po-Ren, Mitarai Satoshi, Ato Manabu, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 64
2. 論文標題 A novel DNA chromatography method to discriminate Mycobacterium abscessus subspecies and macrolide susceptibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 103187 ~ 103187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.103187	査読の有無 有
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 Fukano Hanako, Terazono Tsukasa, Hirabayashi Aki, Yoshida Mitsunori, Suzuki Masato, Wada Shinpei, Ishii Norihisa, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Human pathogenic <i>Mycobacterium kansasii</i> (former subtype I) with zoonotic potential isolated from a diseased indoor pet cat, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Emerging Microbes & Infections	6. 最初と最後の頁 220 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/22221751.2021.1878935	査読の有無 有
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 Yoshida Mitsunori, Fukano Hanako, Asakura Takanori, Suzuki Masato, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Mycobacterium heckeshornense JCM 15655 ^T , Closely Related to a Pathogenic Nontuberculous Mycobacterial Species, Mycobacterium xenopi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 103187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00020-21	査読の有無 有
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 4.Fukano H, Yoshida M, Kazumi Y, Fujiwara N, Katayama K, Ogura Y, Hayashi T, Miyamoto Y, Fujimoto N, Hongsheng W, Mizumoto C, Koizumi Y, Maeda H, Hiranuma O, Mitarai S, Ishii N and Hoshino Y.	4. 巻 68(8)
2. 論文標題 Mycobacterium shigaense sp. nov., a slow-growing, scotochromogenic species, is a member of the Mycobacterium simiae complex group.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Syst Evol Microbiol	6. 最初と最後の頁 2437-2442
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 有
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 5. Fukano H, Yoshida M, Shimizu A, Iwao H, Katayama Y, Omatsu T, Mizutani T, Kurata O, Wada S, Hoshino Y.	4. 巻 6(21)
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Mycobacterium montefiorensis Isolated from Japanese Black Salamander (<i>Hynobius nigrescens</i>).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome A.	6. 最初と最後の頁 e00448-18
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 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 Nakanaga K, Ogura Y, Toyoda A, Yoshida M, Fukano H, Fujiwara N, Miyamoto Y, Nakata N, Kazumi Y, Maeda S, Ooka T, Goto M, Tanigawa K, Mitarai S, Suzuki K, Ishii N, Ato M, Hayashi T, Hoshino Y.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Naturally occurring a loss of a giant plasmid from <i>Mycobacterium ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i> makes it non-pathogenic.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8218
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 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 Yoshida M, Fukano H, Ogura Y, Kazumi Y, Mitarai S, Hayashi T, Hoshino T.	4. 巻 6(25)
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of " <i>Mycobacterium shigaense</i> " .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome A	6. 最初と最後の頁 e00552-18
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 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 Yoshida M, Nakata N, Miyamoto Y, Fukano H, Ato M, Hoshino Y.	4. 巻 365(23)
2. 論文標題 A rapid and non-pathogenic assay for association of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> gyrBA mutations and fluoroquinolone resistance using recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiol Lett	6. 最初と最後の頁 -
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 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深野 華子、吉田 光範、鹿住 祐子、有川 健太郎、 岩本 明忠、星野 仁彦
2. 発表標題 地域特性を疑う新規同定抗酸菌Mycobacterium shigaense の特徴とその感染源についての調査研究
3. 学会等名 日本結核病学会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------