

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08938

研究課題名（和文）抗酸菌のnon-coding RNA解析を進展させた新たな治療手段の開発

研究課題名（英文）Analysis of mycobacterial non-coding RNA promotes the fundamental understanding for newly developing antimycobacterial therapies and strategies.

研究代表者

吉田 敦（Yoshida, Atsushi）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40364541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：迅速発育抗酸菌を全国から500株以上収集し、遺伝子同定、薬剤感受性、マクロライド耐性機構の結果を得た。検体間、分離地域間で菌種に差があること、およびM. abscessus感染症の新たな治療の選択肢について報告することができた。分離株の全ゲノム解析では、外来性の因子との関連を明らかにするとともに、同一患者由来で、複数の薬剤に誘導耐性を獲得したM. abscessus 5株について、SNPの変異が経時的に増加することを見出した。この5株間の比較で、クラリスロマイシン投与下で発現が増加するRNAを見出しており、詳細な解析を実施しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数の迅速発育抗酸菌の臨床分離株を用いた解析により、アルベカシン、シタフロキサシン、リファブチンが治療選択のオプションとなりうることを示した。さらに下気道検体では有意にM. abscessusの割合が高いこと、北日本では有意にM. abscessusの分離割合が高いことを見出した。一方ゲノム解析では、臨床分離株はしばしば外来性の因子を有すること、さらに複数の薬剤に誘導耐性を有しても、SNPの変異数はそれほど多くは増加しないことが明らかになった。転写レベルでの変化が主体であると推測されたが、関与するRNA、non-coding RNAの同定には、条件検討を含む詳細な解析が必要であった。

研究成果の概要（英文）：More than 500 strains of rapidly growing mycobacteria (RGM) were collected from all over Japan, and the results of gene identification, drug susceptibility, and macrolide resistance mechanism were obtained. We were able to report the differences in bacterial species between specimens and isolated areas, and proposed new treatment options for M. abscessus infection. Whole-genome analysis of isolates revealed genetic features of RGM including mobile elements, and accumulation of SNP mutations over time in 5 strains of M. abscessus subsp. abscessus, which were derived from the same patient and acquired inducible resistance to multiple drugs. By comparing these five strains, we have found RNA whose expression is increased under the administration of clarithromycin, and we are conducting a detailed analysis.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：迅速発育抗酸菌 同定 薬剤感受性 誘導耐性 ゲノム解析 non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

迅速発育抗酸菌 (rapidly growing mycobacteria: RGM) は手術部位感染症、菌血症、デバイス感染症、腹膜炎など様々な感染症の原因となり、本邦での罹患率は増加している。難治性であることが最大の問題であり、それには多剤耐性であること、バイオフィームを作って存在すること、免疫不全者で医療感染感染や播種性感染症を来しやすいことが、主な原因である。また手術部位感染症や処置に伴う感染症では、集団感染を来した例も知られている。

RGM の中では *M. abscessus*、*M. chelonae*、*M. fortuitum* の 3 菌種が主に分離されるが、特に *M. abscessus* subsp. *abscessus* と *M. abscessus* subsp. *bolletii* は治療のキードラッグであるクラリスロマイシン (CAM) に耐性を示すことが多く、有効な抗菌薬はほとんどない。したがって抗微生物薬による治療は限界で、本菌の抑制のためには、まったく新しい手段を模索しなければならない。

本研究では、細菌の non-coding RNA 領域に焦点をあて、難治要因に相関していると思われる領域を検索するとともに、治療応用が可能かどうか探索した。つまり「non-coding RNA の解析は菌の抑制に役立つ手段を提供できるか」が問いであった。

2. 研究の目的

本検討の目的は、RGM の臨床分離株の non-coding RNA 領域を解析し、それに関する情報を得ることであるが、最終的には、non-coding RNA 領域を活かした治療手段の提供、である。しかしながら抗酸菌の non-coding RNA 領域に関する情報は、特に RGM となると極めて乏しい。結核菌であっても small RNA の候補は 200 個程度しか見つかっておらず、その機能も不明が多かった。

3. 研究の方法

(1) 臨床分離株の収集および薬剤感受性の測定

他施設から解析依頼を受けた株に加えて、全国規模で RGM 分離株の収集および臨床的背景の調査を進めていた。これらの臨床分離株について、遺伝子同定、マクロライド耐性機構、薬剤感受性試験の結果を得た。

(2) 解析株の選定と全ゲノム解析、RNA シークエンス

(1) で収集した臨床分離株について、解析対象を選定した。選定には菌種や感染症の病態を考慮して、耐性誘導株や、治療前後で得られた株を含めた。続いて基準株と臨床分離株について、全ゲノム解析、RNA シークエンス (non-coding RNA、small RNA) を行った。

(3) 得られた RNA の解析と条件検討

臨床状況と、得られた RNA シークエンスとの関係を解析した。さらに薬剤添加下で培養を行って RNA を採取し、シークエンスを行って、RNA プロファイルの比較を行うこととした。

4. 研究成果

(1) 臨床分離株の収集および薬剤感受性の測定

全国から RGM の臨床分離株を 500 株以上収集し、菌種同定と薬剤感受性 (24 薬剤)、マクロライド耐性に関与する *erm* 遺伝子の配列と変異、アミノグリコシド・フルオロキノロン耐性機構について結果を得た。この中で、薬剤感受性結果により、アルベカシン、シタフロキサシン、リファブチンが治療選択のオプションとなりうることを示し、英文誌に投稿、受理された。さらに決定された菌種について、下気道検体では有意に *M. abscessus* の割合が高いこと、北日本は他の地域に比べ有意に *M. abscessus* の分離割合が高いことを見出し、英文誌に報告した。

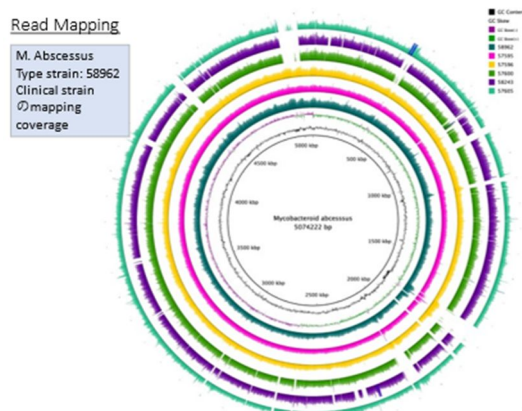
(2) 解析株の選定と全ゲノム解析

解析対象を、菌種、臨床診断名の異なるもの、さらには同一患者由来の耐性誘導株とした。*M. abscessus* の全ゲノム解析では、標準菌株と比較し、複数の菌株に共通する欠失を多数認め (次ページ図 1)、外来性の因子の有無も異なっていた (次ページ図 2)、SNP 数、MNP 数についても臨床分離株間で大きな差を認めた。これらの差異が薬剤感受性の違いに反映されている可能性を考えた (なお今回、ショートリードによるシークエンスのみではプロファージ、プラスミドの配列を十分構成できなかったため、MinION を用いたロングリードシークエンスを導入した。これによりプロファージ、プラスミドともに配列が決定できた)。

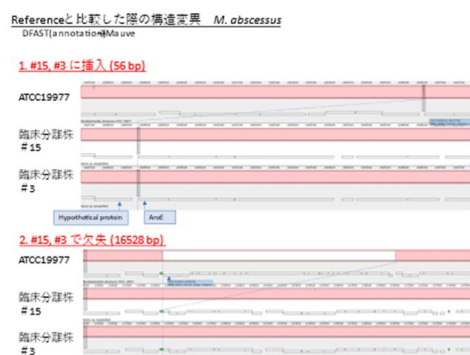
一方、治療開始後に複数の薬剤に同時に耐性が誘導された例があった。この患者から治療前後に得られた *M. abscessus* subsp. *abscessus* 5 株について、全ゲノム解析を行った。ゲノムを比較すると、SNP の変異が治療経過に伴って増加 (蓄積) していったが、この中にはペニシリン

結合蛋白やメチラーゼ、MCE 蛋白が含まれていた。ペニシリン結合蛋白はラクタム薬の MIC の上昇に、メチラーゼは DNA の修飾に関与した可能性を推測した。しかしながら既報の *whiB7* 領域や、塩基対形成を促進する Sm/LSm ファミリータンパク Hfq をコードする領域には、変異は認められなかった。

(図 1)



(図 2)



(脚注)

(図 1) *M. abscessus* の標準菌株、臨床分離株の全ゲノムの比較

(図 2) ロングリードシーケンスで解析した臨床分離 *M. abscessus* (# 15、 # 3 は同一患者由来) 標準菌株 ATCC19977 と比較し、ファージ配列が欠失 (下段)

(3) RNA シークエンスと解析、条件検討

(2) で調べた同一患者由来の 5 株について、全 RNA と、200 塩基以下の RNA (small RNA) を抽出し、ゲノム配列にマッピングするとともに、発現量を比較した。全 RNA では、5 株間で有意な発現量の差は認められなかった。一方で miRDcep2 による機能解析では、新たな miRNA の候補として、129 個が予想された。

全 RNA で有意な差が認められなかった理由としては、抗菌薬曝露下の RNA 抽出ではなかったことが考えられた。このためクラリスロマイシンの希釈系列を作成し、その濃度ごとに菌を培養したところ、培養時間の延長とともに、発現が増加する RNA が存在した。現在その RNA についてシーケンスを行い、特徴を明らかにしている最中である。

治療中に耐性が誘導されたこれら 5 株間で、発現が異なる RNA の対象遺伝子が決定されれば、薬剤感受性と患者の臨床経過の両方を考慮した責任遺伝子とその発現を知ることになる。

(4) 今後の研究の発展

薬剤の誘導耐性に関する遺伝子の機能を、RNA、non-coding RNA のレベルでさらに解明する。次いでこの遺伝子の機能を抑制する新規物質・メカニズムを探索する。

一方で、RGM のプロファージ・プラスミドが、実際に臨床分離株でどの程度多様性に富み、難治性と関連しているのかを追究する。近年、世界では難治性の *M. abscessus* 感染症例に対し、マイコバクテリオファージを用いたファージ療法が臨床応用された。この背景を考慮し、ファージ療法を行う際に問題となるファージへの耐性獲得や、プロファージの機能、溶原性ファージの形成についても研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kamada K, Yoshida A, Iguchi S, Arai Y, Uzawa Y, Konno S, Shimojima M, Kikuchi K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Geographical distribution and regional differences in 532 clinical isolates of rapidly growing mycobacterial species in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84537-7	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 Kurokawa K, Harada N, Sasano H, Takagi H, Takei S, Nakamura A, Kamada K, Yoshida A, Kikuchi K, Takahashi K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Pulmonary infection due to fluoroquinolone-resistant Mycolicibacterium fortuitum: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Infect Dis	6. 最初と最後の頁 866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-020-05596-1	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 15. 徳田美香, 曾木広信, 吉田 敦, 阿保一茂, 松谷 暁, 水島 遼, 鎌田啓佑, 板倉泰朋, 井口成一, 鷗澤 豊, 荒井裕子, 菊池 賢.	4. 巻 30
2. 論文標題 Mycobacterium wolinskyiによる人工膝関節置換術後膝関節炎の1例.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学雑誌	6. 最初と最後の頁 80-83
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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田 敦, 鎌田啓佑, 菊池 賢
2. 発表標題 パネルディスカッション7 迅速発育抗酸菌感染症の治療選択
3. 学会等名 日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 敦, 鎌田啓佑, 菊池 賢
2. 発表標題 Key note lecture 9 比較的まれな非結核性抗酸菌症の臨床と検査
3. 学会等名 日本臨床微生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田啓佑, 吉田 敦, 板倉泰朋, 井口成一, 鶴澤 豊, 菊池 賢
2. 発表標題 日本におけるM. fortuitumのニューキノロン系抗菌薬に対する感受性とQRDR領域の遺伝子変異の関係
3. 学会等名 日本感染症学会東日本地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamada K, Yoshida A, Mizushima R, Itakura Y, Iguchi S, Arai Y, Uzawa Y, Shimojima M, Kikuchi K.
2. 発表標題 Geographical Distribution and Regional Difference among Clinical Isolates of Rapidly Growing Mycobacterial Species in Japan
3. 学会等名 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamada K, Yoshida A, Mizushima R, Itakura Y, Iguchi S, Arai Y, Uzawa Y, Shimojima M, Kikuchi K.
2. 発表標題 Antimicrobial Susceptibilities to 24 drugs of 491 Rapidly Growing Mycobacteria from Clinical Isolates in Japan
3. 学会等名 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 敦、鎌田啓佑、板倉泰朋、井口成一、鶴澤 豊、菊池 賢
2. 発表標題 肺外の迅速発育抗酸菌感染症の治療選択 従来の薬剤の限界と新規薬剤の応用
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
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田 敦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社プレジジョン	5. 総ページ数 オンラインWEB版
3. 書名 今日の疾患辞典	

〔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
研究 分担者	菊池 賢 (Kikuchi Ken) (60214748)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	

	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
研究 協力者	大瀬 賢介 (Oze Kensuke)		
研究 協力者	豊田 雅士 (Toyoda Masashi)		

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
---------	---------