

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17205

研究課題名(和文)細胞内pH制御が関与する自然免疫システムに着目した肺MAC症発症機序の解明

研究課題名(英文)A innate immune defense system against Mycobacterium avium pulmonary disease based on intracellular pH homeostasis

研究代表者

吉田 光範(Yoshida, Mitsunori)

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：70772630

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)：本研究は、肺MAC症の発症機序として「CHP2遺伝子の発現量が低下したことで、MAC感染時における細胞内pH制御に基づいた炎症応答および殺菌機構が阻害される」という仮説を立てて検証することを目的とした。ヒト肺胞上皮細胞株においてCHP2をノックダウンした細胞株ではMAC菌株の感染効率が上昇している傾向にあったが、感染後の細胞内菌量に有意な差は認められなかった。CHP2が生体内でMACの殺菌機構に関与している可能性を検証するため、CHP2ノックアウトマウスを作成した。しかしながら、ホモ個体の生殖効率が低下し個体数を維持することが出来なかったため、計画していた検討を行えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の先進国を中心とした肺MAC症患者の急増から、肺MAC症の発症機序の解明と新たな診断方法および治療方法の開発は、今後さらに重要性が増すことが予想される研究分野である。本研究から、CHP2遺伝子がヒトの肺胞上皮細胞におけるMAC菌株の感染効率に関与している可能性が示唆された。将来的に、CHP2遺伝子が関与する肺MAC症の発症機序を証明することができれば、得られた知見に基づいた創薬研究、診断方法や治療法開発などへの展開も十分に期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to test the hypothesis that reduced CHP2 gene expression inhibits the inflammatory response and bactericidal mechanisms based on intracellular pH regulation during pulmonary MAC infection. In human alveolar epithelial cell lines, CHP2 knockdown tended to increase the infection efficiency of MAC strains, but no significant difference in intracellular bacterial content after infection was observed. To test the possibility that CHP2 is involved in the bactericidal mechanism of MAC in vivo, CHP2 knockout mice were generated. However, planned tests could not be carried out because the reproductive efficiency of the homozygous individuals was reduced.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：非結核性抗酸菌症 発症機序

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌感染症は結核、ハンセン病、および非結核性抗酸菌(NTM)症に大別される。結核やハンセン病とは対照的に、NTM 症の患者数は先進国を中心に世界中で増加している。最近の疫学調査から、本邦における肺 NTM 症の罹患率は 14.7 と算出され、結核のそれ(= 12.9)を上回った(Namkoong H ら (2016))。NTM は水や土壌などに普遍的に存在する環境菌であり、誰もが日常的に曝露されているにも関わらず一部のヒトのみで発症することから、宿主側の疾患感受性遺伝子の存在が推察されてきた。この疫学的根拠として、米国におけるアジア人の罹患率が他人種と比較して高いことや家族集積性の存在などがあげられる(Adjemian J ら (2012), Prevots DR ら (2012))。

肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症は本邦において肺 NTM 症の 89%を占める(Morimoto K ら (2014))。申請者が所属する研究グループは、日本人における肺 MAC 症の疾患感受性遺伝子について網羅的な探索を行ってきた。非血縁日本人の肺 MAC 症患者集団 475 例に対して、日本人ゲノムに最適化された一塩基多型(SNP)アレイであるジャポニカアレイ(Kawai Y ら (2015))を用いて SNP タイピングを行った。非血縁健常者集団 417 例のデータを対照にしたケース・コントロール関連解析を実施したところ、16 番染色体領域に SNP が 1 つ検出された。さらに、imputation 法により 16 番染色体領域に発症の関連を示唆する SNP が新たに 50 個検出された。これらについて、上記の検体とは独立した日本人肺 MAC 症患者 591 例および健常者 718 例を用いた再現解析を DigiTag2 法(Nishida N ら (2007))により行い、上記の解析とあわせて評価したところ、肺 MAC 症発症とゲノムワイド水準で有意に関連する SNP が 2 つ見いだされた(Namkoong H ら (2021))。

肺 MAC 症の発症と関連する SNP(s)の存在が明らかになったが、これらの遺伝子変異と肺 MAC 症の発症機序との関係は不明である。新たに発見された SNP(s)は、16 番染色体上の *CHP2* (calcineurin like EF-hand protein 2) 遺伝子におけるイントロン領域および約 23 Kbp 下流に位置していた(Namkoong H ら (2021))。検出された SNP(s)と、体組織における *CHP2* 遺伝子の発現量との相関を GTEx portal データベース(Lonsdale J ら (2013))により解析したところ、リスクアレルをホモで持つ個体は肺組織における *CHP2* 遺伝子の発現量が有意に低下していること、一方で末梢血における発現量に差がみられないことがわかった。これらから、*CHP2* 遺伝子にはイントロン領域または下流領域に発現量の調節に関わる部位が存在し、肺組織における *CHP2* 遺伝子の発現量の低下が肺 MAC 症の発症につながっていることが推察された。*CHP2* は Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)の C 末端領域に結合し、細胞内 pH や浸透圧などの細胞内環境の制御に関わる。*CHP2* の結合が NHE の輸送活性に必須であることが示されている(Pang T ら (2001, 2002))。肺 MAC 症と pH などの細胞内環境制御との関連はこれまで報告されておらず、新たな発症機序の発見につながることを期待された。

2. 研究の目的

肺 MAC 症は、近年患者数の増加が著しい慢性呼吸器疾患であるが、発症機序は解明されておらず、有効な治療法も確立されていない。申請者らの検討により、肺組織において細胞内 pH 制御に関わる *CHP2* 遺伝子の発現量の低下が肺 MAC 症の発症に関連していることが示された。本研究は、肺 MAC 症の新たな発症機序として「*CHP2* 遺伝子の発現量が低下したことで、MAC 感染時における細胞内 pH 制御に基づいた炎症応答および殺菌機構が阻害される」という仮説を立ててこれを検証する。具体的には、

1. 肺胞細胞において、*CHP2* が MAC 感染時における炎症応答に関与していることを証明すること、
2. 培養細胞において、*CHP2* が細胞内 pH 制御および MAC の殺菌機構に関与していることを証明すること、

哺乳類の生体内において、*CHP2* が MAC の殺菌機構に関与していることを証明すること、を目的とする。

3. 研究の方法

CHP2 が MAC 感染時における炎症応答に関与している可能性を検証する

A549 細胞株に加えて、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B、HL-60 細胞株からレチノイン酸により分化させた好中球、THP-1 細胞株から PMA により分化させたマクロファージを用いて遺伝子発現解析を行う。BEAS-2B、HL-60 および THP-1 について shRNA により *CHP2* 遺伝子をノックダウンした細胞株(CHP2KD 細胞株)を作成する。赤色蛍光タンパク質 YPet をプラスミドにより導入した

TH135 株を、CHP2KD および野生型細胞株に感染させる。感染直後、5 時間および 12 時間経過後の細胞株を回収して固定後、RNAseq 解析を行い、感染後時間経過にともなう細胞株の遺伝子発現プロファイルを取得する。比較対照として各時間点の非感染細胞株を用いる。RNAseq により得られたリードは、HISAT2 プログラムによりヒトゲノム配列 GRCh38/hg38 にマッピングし、featureCounts プログラムにより各遺伝子にマッピングされたリード数を計測したのちに正規化方法の異なる edgeR プログラムまたは DEseq2 プログラムにより発現変動遺伝子を検出する。

CHP2が細胞内pH制御、自然免疫による殺菌機構に関与している可能性を検証する

CHP2 は NHE と共役して細胞内小器官や細胞質の pH を制御する。宿主細胞の殺菌機構として、エンドサイトーシスにより菌を取り込んだファゴソームが、エンドソームとの融合を経て、最終的にリソソームと融合(P-L fusion)して菌を加水分解する食作用がある。リソソームの加水分解酵素カテプシンは pH 依存的に酵素活性が変化する。また、エンドソームに局在する TLR9 (Toll-like receptor 9)を介した免疫応答では、TLR9 はカテプシンにより pH 依存的に活性化される。TLR9 は MAC の感染防御に必要であることも示されている(Carvalho NB ら (2011))。そこで本研究では、肺細胞において CHP2 が細胞内 pH の制御に関与している可能性を検証する。CHP2KD 細胞株において、高感度 pH プロープにより蛍光標識したデキストランを取り込ませたのちに蛍光イメージング法によりエンドソームの pH を測定する(Takahashi S ら (2018))。また、同様の pH プロープを自由拡散により取り込ませて細胞質の pH を測定する。次に、CHP2KD 細胞株の菌感染時における細胞質およびエンドソームの pH を測定する。

CHP2 が生体内で MAC の殺菌機構に関与している可能性を検証する

CHP2KO マウスに対して、TH135 株を気管挿管により肺に感染させる。マウスは感染後 7 日ごとに殺処分し、肺組織を固定後 HE 染色およびチール・ネルゼン染色を行ない、肺組織における MAC の感染効率および炎症細胞浸潤を評価する。肺組織のホモジネートを用いて 7H10 培地に塗布し、肺組織内の菌量を CFU (colony forming unit)の形で測定する。また、気管支肺洗浄液を用いて、感染後時間経過にともなう炎症因子の発現を Luminex assay、遊走炎症細胞の数および種類を FACS 法により測定する。比較対照として、同一背景の野生型マウスを用いる。これらの結果から、CHP2 が生体内で MAC の殺菌機構に関与していることを証明する

4. 研究成果

ヒト II 型肺上皮細胞株 A549 において、CHP2 遺伝子を shRNA によりノックダウンした細胞株(A549-CHP2KD)を作成し、進行性肺 MAC 症患者より単離された *Mycobacterium (M.) avium* subsp. *hominissuis* TH135 株を感染させた。CHP2 遺伝子を過剰発現させた細胞株(CHP2OE)、あるいは肺 MAC 症の発症と有意に関連する CHP2 遺伝子下流の SNP 領域(Namkoong ら, 2021, ERJ)を CRISPR 法によりノックアウトした変異株を 4 種類作成した(CHP2DSK01-4)。これらの細胞株に対して MAC に YPet を導入した菌株を感染させ、セルソーターをもちいた菌の感染効率評価と、感染後時間経過に伴う細胞内菌量を CFU あるいはハイコテントイメージングシステムにより評価した。野生型株と比較して CHP2KD および CHP2DSK0 細胞株では感染効率が上昇している傾向にあったが、いずれの細胞株においても感染後時間経過にともなう細胞内菌量に有意な差は認められなかった。これらの結果から、CHP2 が MAC 感染における初期防御に関与している可能性が示唆された。また、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞株についても、同様の細胞株を作成した。今後これらの細胞株をもちいた検討を行う予定である。次に、MAC 感染における CHP2 の役割を調べた。A549-WT では、感染後 5 時間で CHP2 遺伝子の発現が 5-8 倍に増加していることをリアルタイム PCR 法により確認した。続いて、A549-CHP2KD の MAC 感染時における遺伝子発現プロファイルを RNAseq により取得した。興味深いことに、感染後 5 時間で A549-WT においてケモカインをコードする遺伝子が多数発現上昇していたのに対して、A549-CHP2KD ではそれらの遺伝子の発現上昇はみられなかった。これらの結果から、A549-CHP2KD では MAC 感染時の炎症応答が遅延または減弱しており、CHP2 が MAC 感染時における炎症応答に関与している可能性が考えられた。CHP2KD 細胞株において、高感度 pH プロープによりエンドソームの pH を測定するための条件検討を行った。今後、作成した細胞株を用いて pH 測定を行う予定である。

CHP2 が生体内で MAC の殺菌機構に関与している可能性を検証するため、CHP ノックアウトマウスを作成した。しかしながら、CHP2 ノックアウトマウスのホモ個体の生殖効率が低下し、必要な個体数を維持することが出来なかつたため、研究計画時に予定していた肺組織における MAC の感染効率および炎症細胞浸潤、肺組織内の菌量測定を行うことができなかった。今後、ホモ個体数の維持ができれば、上記検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|------------------------------|
| 1. 著者名 Fukano H, Yoshida M, Kazumi Y, Sakagami N, Ato M, Mitarai S, Hoshino Y | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Complete Chromosomal Genome Sequence of Mycobacterium sp. Strain IWGMT90018-18076. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc. | 6. 最初と最後の頁 e0007822 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00078-22 | 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 Fukano H, Nakanaga K, Goto M, Yoshida M, Ishii N, Hoshino Y. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Therapeutic efficacy of rifalazil (KRM-1648) in a M. ulcerans-induced Buruli ulcer mouse model | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0274742 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0274742 | 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 M, Fukano H, Suzuki M, Hoshino Y | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum JCM 6387, a Type Strain of Human-Pathogenic Mycobacteria Showing Inducible Macrolide Resistance | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e0006022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00060-22 | 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, Chien JY, Morimoto K, Kinjo T, Aono A, Murase Y, Fujiwara K, Morishige Y, Nagano H, Jou R, Hasegawa N, Ato M, Hoshino Y, Hsueh PR, Mitarai S | 4. 巻 Ahead of Print |
| 2. 論文標題 Molecular Epidemiological Characteristics of Mycobacterium abscessus Complex Derived from Non-Cystic Fibrosis Patients in Japan and Taiwan | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Spectrum | 6. 最初と最後の頁 Ahead of Print |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.00571-22 | 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 該当する |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Mitsunori Yoshida, et al. | 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 |
| 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ho Namkoong, Yosuke Omae, Takanori Asakura, Makoto Ishii, Shoji Suzuki, Kozo Morimoto, Yosuke Kawai, Katsura Emoto, Andrew J. Oler, Eva P. Szymanski, Mitsunori Yoshida, et al. | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Genome-wide association study in patients with pulmonary Mycobacterium avium complex disease | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Respiratory Journal | 6. 最初と最後の頁 1902269 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.02269-2019 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mitsunori Yoshida, et al. | 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 e00020-21 |
| 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Hanako Fukano, Tsukasa Terazono, Aki Hirabayashi, Mitsunori Yoshida et al. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Human pathogenic Mycobacterium kansasii (former subtype) 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Tomomi Kawakita, Tetsu Mukai, Mitsunori Yoshida et al. | 4. 巻 167 |
| 2. 論文標題 Point mutation in the stop codon of MAV_RS14660 increases the growth rate of Mycobacterium avium subspecies hominissuis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology | 6. 最初と最後の頁 NA |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.001007 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

| | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 肺非結核性抗酸菌症の疾患感受性の判定方法 | 発明者 星野仁彦、吉田光 範、長谷川直樹、徳 永勝士 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-123054 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|--|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 抗酸菌のerm(41)遺伝子の一塩基変異を判別する方法、その方法に用いるプローブ及びプライマーセット | 発明者 星野仁彦、吉田光 範、佐野創太郎、宮 本重彦 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-066277 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 マイコバクテロイデス・アブセッサスを検出するためのプライマーセット、キット及び方法 | 発明者 星野仁彦、吉田光 範、佐野創太郎、宮 本重彦 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-066306 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 マイコバクテロイデス・アブセッサス・コンプレックスに属する抗酸菌のerm(41)遺伝子の一塩基変異を判別する方法、その方法に用いるプライマーセット及びプローブ | 発明者 星野仁彦、吉田光 範、佐野創太郎、宮 本重彦 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願PCT/JP2021/014128 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|