

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16108

研究課題名（和文）加齢が肺非結核性抗酸菌症におよぼす影響の検証

研究課題名（英文）The effect of aging in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease

研究代表者

松山 政史（Masashi, Matsuyama）

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：老齢マウスは若齢マウスと比較してNTMの感染感受性が高いことが明らかにされた。また、感染2カ月後のマウス肺組織で、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、老齢マウス肺では若齢マウス肺と比較してSecretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)の発現が低いことが明らかにされた。SLPIはM. aviumに対して、直接的に抗菌活性を有することが明らかにされ、肺NTM症の感染制御に関与することが示された。また、Nrf2に制御されるSLPIの発現低下が、老齢マウスにおけるM. avium菌の感染感受性亢進の一要因であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺NTM症は高齢者に多くみられ、65歳以上の患者で死亡率が上昇することが報告されているが、その理由は不明であった。我々は、加齢が肺NTM症におよぼす影響の一部を明らかにすることができた。Nrf2に制御されるSLPIの発現低下が、加齢により肺NTM症が悪化する理由の一つであるという事実は、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。SLPIやNrf2を活性化する薬剤を肺NTM症患者に使用するという可能性は、社会的意義がとても大きい。また、今回の老齢NTM感染マウス肺組織の網羅的遺伝子発現解析の結果は、他の新たなシーズを生み出す可能性も秘めている。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effect of aging on pulmonary nontuberculous mycobacterial (NTM) disease, experiments were conducted in which old and young mice were infected with Mycobacterium avium (M. avium) bacteria. The results showed that old mice were more susceptible to NTM infection than young mice. In addition, comprehensive gene expression analysis by RNA-seq was performed in lung tissues two months after infection. The results showed that the expression of secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) was lower in the lungs of old mice compared to those of young mice. SLPI was found to have direct antimicrobial activity against M. avium, indicating that SLPI is involved in the control of pulmonary NTM disease. Moreover, Western blotting results suggested that decreased expression of SLPI, which is regulated by Nrf2, is one important factor of exacerbation in pulmonary NTM infection in old mice.

研究分野：肺非結核性抗酸菌症

キーワード：肺非結核性抗酸菌症 加齢 Nrf2 SLPI

#### 1. 研究開始当初の背景

肺非結核性抗酸菌(NTM)症の罹患率は世界的に増加傾向にある。日本において、その原因の多くは、*Mycobacterium avium* か *Mycobacterium intracellulare* によるものであり、両者をまとめて肺 MAC 症とも言う。肺 NTM 症は高齢者に多くみられ、65 歳以上の患者で死亡率が上昇することが報告されているが、その理由は不明である。

申請者らは、抗酸化ストレス因子である *Nrf2* と *Th1* 細胞が NTM 感染に対して防御的に働くことを明らかにしてきた。*Nrf2* と *Th1* 細胞は加齢に伴い、その機能が低下することが知られている。従って本研究では、肺 NTM 症における加齢の影響を *Nrf2*、および *Th1* 細胞の観点から明らかにし、新規標的治療といった臨床応用へ展開するための基盤となる成果を目指した。

#### 2. 研究の目的

肺 NTM 症における加齢の影響を、マウスモデルと肺 NTM 症患者由来全血細胞の網羅的遺伝子発現解析から明らかにすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

マウスモデルの研究において、メスの BALB/c マウスを用いて、生後 1 年 6 カ月の老齢マウスと生後 8 週の若齢マウスに *Mycobacterium avium* 菌を経気道感染させ、感染後のフェノタイプや感染肺の発現遺伝子を比較した。*M. avium* 菌として肺 MAC 症患者臨床分離株 *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* を実験に用いた。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、気管支肺泡洗浄液を評価し、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。

肺 NTM 症患者由来全血細胞の網羅的遺伝子発現解析では、全部で 100 例の患者がエントリーし、全血細胞の網羅的遺伝子発現解析を RNA-seq で実施した。

#### 4. 研究成果

マウス研究では、感染後 2 ヶ月の時点で肺内の *Mycobacterium avium* の菌量が老齢マウスで多くなり、また死亡率も高くなることが確認された (図)。また、感染肺組織に対する RNA-seq では、若齢マウスと老齢マウス間で 535 個の発現変動遺伝子を認めた (FDR<0.05)。IPA による pathway 解析を実施すると、予想通り、老齢感染マウス肺組織では、若齢感染マウス肺組織と比較して *Th1* 経路の活性が低下していた。

加齢がおよぼす影響をより、詳細にするために、より強いフィルターで老齢感染肺組織と若齢感染肺組織を比較すると、136 個 (FDR<0.001、Fold change>2) の変動遺伝子を得ることができた。この 136 個でヒートマップを作成し、感染時に老齢マウスと比較して、若齢マウスで発現が強く出る遺伝子群に着目した。感染時に、老齢マウス、若齢マウスともに誘導され、感染時に老齢マウスと比較して若齢マウスで発現が強い遺伝子群が存在し、その中には、Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)が含まれていた (図)。

SLPI は、好中球エラスターゼの働きを抑制するタンパクであるが、抗炎症作用に加えて、抗菌活性も有することが報告されている。しかし、NTM 感染時の働きや、NTM への抗菌作用は明らかではなかったため、SLPI に注目して研究を進めていくこととした。

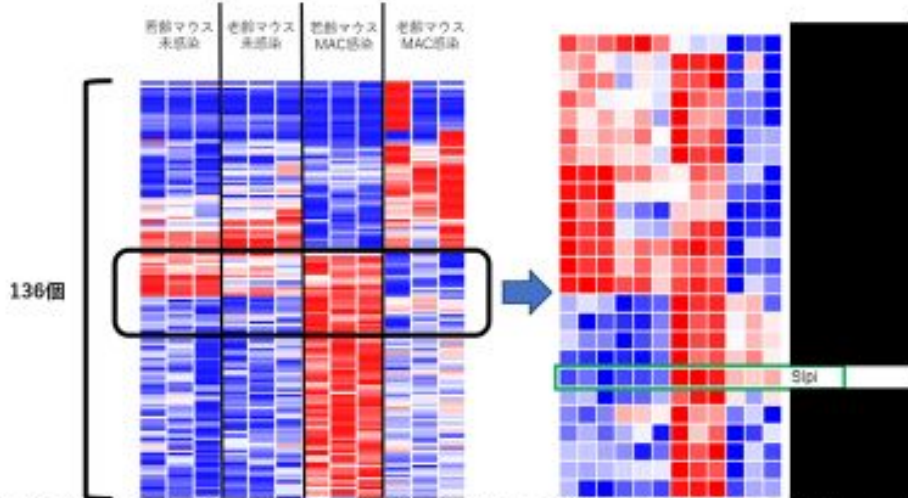
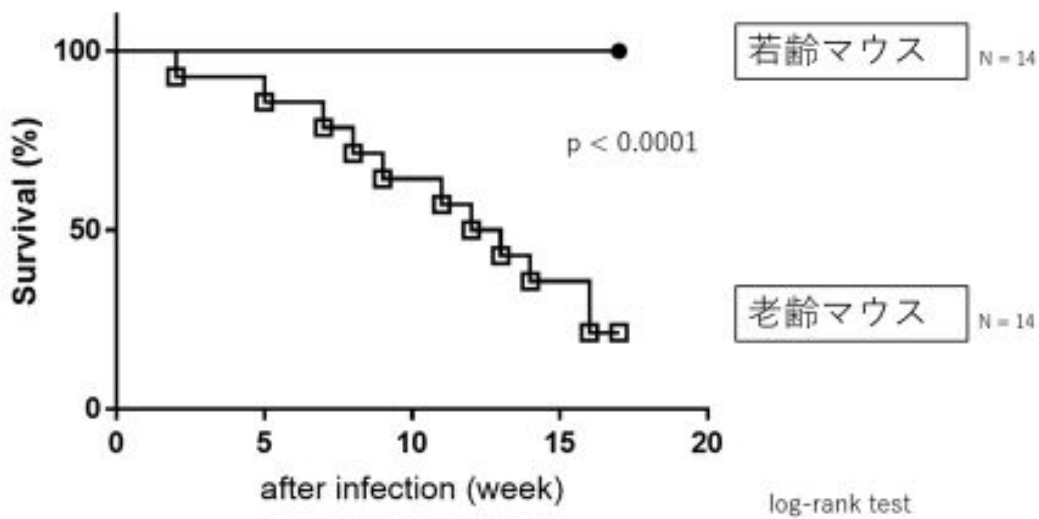
In vitro の実験で、*Mycobacterium avium* 菌に SLPI を直接投与する実験を実施すると、24 時間後、3 日間後、7 日間後、いずれも殺菌作用が確認された (図)。SLPI の免疫染色をマウス感染肺組織で実施したところ、老齢感染肺組織のマクロファージの SLPI の発現が、若齢感染肺組織のマクロファージの発現と比べて低いことが明らかにされた。これらの事実は、SLPI の発現が *Mycobacterium avium* 菌の制御に関与していることを示していた。

次に、老齢感染マウス肺組織で SLPI の発現が低下するメカニズムを明らかにするために、*Nrf2* の活性に注目した。SLPI は *Nrf2* によって制御されることが報告されている。感染肺組織の核内タンパクを抽出し、ウエスタンブロットで *Nrf2* の核内移行の程度を確認したところ、老齢感染マウス肺では、*Nrf2* の活性が若齢感染マウス肺と比較して低下していることが確認された。この結果は、*Nrf2* に制御される SLPI の発現低下が、老齢マウスにおける *Mycobacterium avium* 菌の感染感受性亢進の一要因であることが示唆された。

100 例の肺 NTM 症患者由来全血細胞の網羅的遺伝子発現解析では、年齢が高く、全血細胞の SLPI の遺伝子発現量が低く、胸部 CT 上、肺 NTM 症の病変の程度が高いクラスターが存在することが明らかになった。

上記の結果をまとめ、さらに、老齢感染マウスに SLPI、*Nrf2* 活性化剤 (スルフォラファン) を投与する実験を行った後に論文を完成させ投稿予定である。

# M. avium 感染後の生存率

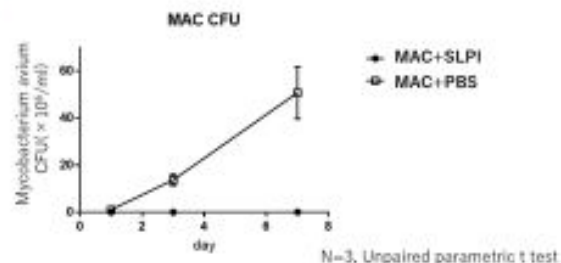
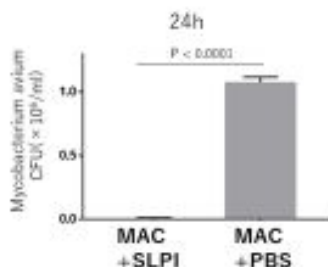


若齢マウスと老齢マウス *M. avium* 感染2ヶ後で発現量に差がある遺伝子 (FDR<0.001、Fold change>2) 136個でヒートマップを作成し、感染時に老齢マウスと比較して、若齢マウスで発現が強く出る遺伝子群に着目した。その中に *SLPI* が含まれていた。

## M. aviumへのSLPIの抗菌活性



$2 \times 10^6$  CFU/mlの *M. avium* 50  $\mu$ lにそれぞれ3.0  $\mu$ MのSLPI、コントロールとしてPBSを加え37°Cで24時間、3日間、7日間インキュベートし、CFUを測定した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsuyama Masashi, Matsumura Sosuke, Nonaka Mizu, Nakajima Masayuki, Sakai Chio, Arai Naoki, Ueda Kodai, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Pathophysiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial (NTM) disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 135 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.12.002	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 Matsuyama Masashi, Nonaka Mizu, Nakajima Masayuki, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of NRF2 in Mycobacterial Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1861 ~ 1861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10121861	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 Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kawaguchi Mio, Matsumura Sosuke, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma Thsering, Yazaki Kai, Tanaka Ryota, Okiyama Naoko, Muratani Masafumi, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Depletion of PD-1 or PD-L1 did not affect the mortality of mice infected with Mycobacterium avium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97391-4	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 Nonaka Mizu, Matsuyama Masashi, Sakai Chio, Matsumura Sosuke, Arai Naoki, Nakajima Masayuki, Saito Takefumi, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Risk factors for clinical progression in patients with pulmonary Mycobacterium avium complex disease without culture-positive sputum: a single-center, retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Research	6. 最初と最後の頁 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40001-023-01152-0	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 松村聡介、松山政史	4. 巻 51
2. 論文標題 非結核性抗酸菌症における新展開 最近の話題 感染免疫における新知見	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 臨床と微生物	6. 最初と最後の頁 75-81
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、中嶋真之、松村聡介、野中水、上田航大、荒井直樹、酒井千緒、石井幸雄、齋藤武文、檜澤伸之	4. 巻 98
2. 論文標題 非結核性抗酸菌感染動物モデル - マウス、霊長類、ゼブラフィッシュを用いた研究を中心に	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kekkaku	6. 最初と最後の頁 107-115
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松村聡介、松山政史、中嶋真之、酒井千緒、藪内悠貴、蔵本健矢、矢崎海、吉田和史、際本拓未、松野洋輔、森島祐子、檜澤伸之
2. 発表標題 マウスモデルを用いた、肺Mycobacterium avium感染における加齢の影響の評価.
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 難治性肺MAC症の治療
3. 学会等名 第97回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会 特別企画2 結核・非定型抗酸菌症治療研究会～旭川サテライトシンポジウム～ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 肺MAC症の病態生理と難治性肺MAC症の治療
3. 学会等名 第251回日本呼吸器学会関東地方会 ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 肺非結核性抗酸菌 (NTM) 症の現状と課題
3. 学会等名 結核・非定型抗酸菌症治療研究会～茨城サテライトシンポジウム～ イブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山政史
2. 発表標題 免疫不全による抗酸菌感染症罹患のメカニズム
3. 学会等名 第96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5「免疫不全に伴う抗酸菌感染症」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 28. 野中水、松山政史、荒井直樹、中嶋真之、松村聡介、酒井千緒、北岡有香、平野瞳、兵頭健太郎、金澤潤、三浦由記子、大石修司、林原賢治、齋藤武文、檜澤伸之
2. 発表標題 中葉・舌区に肺非結核性抗酸菌症疑いの陰影がみられた116例の気管支鏡検査での解析
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会 一般演題
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masashi Matsuyama
2. 発表標題 Host factors of pulmonary nontuberculous mycobacterial (PNTM) disease from basic research
3. 学会等名 NTM Host Research Consortium International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村聡介、松山政史、中嶋真之、酒井千緒、藪内悠貴、蔵本健矢、矢崎海、吉田和史、際本拓未、松野洋輔、森島祐子、檜澤伸之
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析を用いた、肺Mycobacterium avium感染マウスモデルにおける加齢の影響の評価。
3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松村聡介、松山政史
2. 発表標題 肺Mycobacterium avium感染マウスモデルにおける、加齢による感染時宿主応答の変化の評価。
3. 学会等名 第54回抗酸菌治療研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sosuke Matsumura, Masashi Matsuyama, Masayuki Nakajima, Chio Sakai, Yuki Yabuuchi, Kenya Kuramoto, Kai Yazaki, Kazufumi Yoshida, Takumi Kiwamoto, Yosuke Matsuno, Yuko Morishima, Nobuyuki Hizawa
2. 発表標題 Effects of aging on host responses towards pulmonary Mycobacterium avium infection in a mouse model.
3. 学会等名 2024ATS (San Diego) Rapid Abstract Poster Discussion. (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松村聡介、松山政史、中嶋真之、酒井千緒、藪内悠貴、蔵本健矢、矢崎海、吉田和史、際本拓未、松野洋輔、森島祐子、檜澤伸之
2. 発表標題 肺Mycobacterium avium感染マウスモデルにおける、感染時宿主応答に対する加齢の影響の評価。
3. 学会等名 第99回日本結核・非結核性抗酸菌症学会学術講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masashi Matsuyama, Yukio Ishii	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 294
3. 書名 Chapter 2, Immunology: How Does the Immune System Affect the Development of Pulmonary TB? How Does an Understanding of TB Immunology Help Clinicians Manage their Patients with Pulmonary TB? ; Takefumi Saito, Masahiro Narita, Charles L. Daley Editors; Pulmonary Tuberculosis and Its Prevention, Respiratory Disease Series: Diagnostic Tools and Disease Managements, p33-p58 , Springer, 2022	

〔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
---------	---------