

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07121

研究課題名(和文)結核菌イソニアジド耐性に関する新規耐性遺伝子変異の同定とその作用機序の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

切替 照雄(Kirikae, Teruo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50192563

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)：全国で分離された薬剤耐性結核菌254株の全ゲノム情報を解析し、その性状や分布、遺伝子系統、薬剤耐性に関する遺伝子について解析した。これらの254株は5つのLineageに分類され、日本人と外国人の患者由来結核はそれぞれ異なる分布であった。イソニアジド(IHN)耐性結核は188株、リファンピシン(RFP)耐性TBIは12株、IHNとRFPに耐性を示す多剤耐性結核は54株だった。これらの多剤耐性結核のうち、他の主要薬剤に耐性がある超多剤耐性結核は9株で、全ての株が日本人患者由来であった。これらの解析結果を論文としてまとめてmSphereに投稿し、2021年6月に受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全国で分離された薬剤耐性結核菌の全ゲノム情報を解析し、その性状や分布、遺伝子系統、薬剤耐性に関する遺伝子について解析した。これらの結果、日本人と外国人の患者由来薬剤耐性結核はそれぞれ異なる系統の分類を示した。外国人由来の多剤耐性結核菌の割合は日本人由来結核菌の割合より優位に大きかった。外国人由来薬剤耐性結核菌は日本全国の薬剤耐性結核の多様性に優位に影響していた。超多剤耐性結核は日本人の間で伝播していることが分かった。これらの基礎データは、日本における薬剤耐性結核対策の基礎資料を提供する。

研究成果の概要(英文)：Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates were obtained from 254 patients (202 Japan-born and 52 foreign-born) in Japan. The whole genome sequences and lineages of these isolates were determined and phylogenetic trees were constructed. Of the 254 isolates, 54 were multidrug-resistant. The percentages of multidrug-resistant isolates were significantly higher in foreign-born than Japan-born patients. Nine multidrug-resistant isolates were extensively drug-resistant and obtained from Japan-born patients. A significant number of multidrug-resistant M. tuberculosis strains were isolated from foreign-born patients. Foreign-derived isolates affect the nationwide genetic diversity of drug-resistant M. tuberculosis in Japan. Extensively drug-resistant M. tuberculosis isolates were transmitted among the Japanese population. This study was summarized in the following paper;

Mizukoshi F et al: Molecular Epidemiology of Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Japan, mSphere, in press.

研究分野：微生物学

キーワード：結核 薬剤耐性 イソニアジド耐性 薬剤耐性遺伝子 イソニアジド耐性遺伝子 中等度耐性 全ゲノム解析 系統樹解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

結核菌は、特定の遺伝子の変異によって薬剤耐性を獲得する。結核菌薬剤耐性に関与する遺伝子変異とその分子機構を解明することは、薬剤耐性結核の診断・治療法開発のための基盤である。結核の第1選択薬であるイソニアジド (INH) はプロドラッグである。イソニアジドが受動的に結核菌体内に入ると、結核菌が産生するカタラーゼ・ペルオキシダーゼ (KatG) によってイソニアジド-NAD複合体を形成する。この複合体はミコール酸合成酵素の一つである *InhA* と結合し、*InhA* の酵素活性を阻害する。ミコール酸は結核菌細胞壁の主要な構成成分であるので、この合成が阻害されると結核菌は死滅する。イソニアジド耐性機序として1) *katG* 内の特定の遺伝子変異による KatG 酵素活性の低下がイソニアジド耐性を引き起こすこと、2) *inhA* プロモーター領域の変異によって、*InhA* が過剰に産生されることによりイソニアジドに中等度耐性になることが知られていた。申請者は、2009年にイソニアジド耐性結核菌108株を収集して、これらを出発材料にイソニアジド耐性に関連する遺伝子変異の検索を始めた。その結果、64%のイソニアジド耐性菌株が、上記1)及び2)で報告されている遺伝子変異でイソニアジド耐性を説明できた。しかし、残りの菌株のイソニアジド耐性機序は不明であった。申請者らは、これらの菌株を解析することで、これまで知られていなかった2種類のイソニアジド耐性の機序を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、結核菌イソニアジド耐性に関与する新規遺伝子変異を特定することである。そのためには、既知の遺伝子では説明できないイソニアジド耐性臨床分離株を用いて候補となる遺伝子変異を特定し、その変異がどのようにイソニアジド耐性に関与するのかを明らかにする。最終的には、実験結核菌株に変異遺伝子を再構築することでアイソジェニック結核菌株を作成し、新規遺伝子変異がイソニアジド耐性に直接関与することを実証する。本研究の独自性と創造性は、臨床分離結核菌を用いて、そのイソニアジド耐性機構を可能な限り完全に実証しようとするところにある。さらにイソニアジドの抗結核作用の制御に関与する新たな分子を同定する可能性もある。文献やデータベースで公表されている「イソニアジド耐性に関与する変異遺伝子」の多くは薬剤耐性に関与するかどうか不明である。遺伝子シーケンシング技術の発達によってイソニアジド耐性臨床分離結核菌株の遺伝子変異が比較的容易に検出され「イソニアジド耐性結核菌の変異遺伝子」が多数報告されるようになってきた。しかし、科学的な証拠が乏しいまま、これらの変異遺伝子が「イソニアジド耐性に関与する変異遺伝子」と誤った解釈をされる恐れも出てきている。

3. 研究の方法

本研究では、新たに収集したイソニアジド耐性結核菌株のうち、既知のイソニアジド耐性遺伝子変異では説明できない結核菌株を対象に、これらの菌株のイソニアジド耐性遺伝子変異を特定する。遺伝子変異による生化学的機能の変化を解析することによって耐性機構を推定し、合理的な説明ができる遺伝子変異に関しては、マイコバクテリオファージを用いた特殊形質導入法を用いて、遺伝子変異を再構築した実験結核菌株を作成する。国立病院機構の共同研究として、我が国の薬剤耐性結核の治療実態及び薬剤耐性(イソニアジドまたはリファンピシン耐性)結核臨床分離株の解析が実施されている(2016年4月~2018年3月)。申請者は、臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の解析を担当している。これまでの解析では既知の薬剤耐性遺伝子変異では説明できないイソニアジド耐性臨床分離株が166株中12株(7%)存在していた。現在進行している疫学研究では合計280株のイソニアジド耐性菌株を収集する。このうち本研究の対象結核菌株は20株程度と推定している。これらの結核菌株のイソニアジド耐性機構を解明する。これらの多くが、これまでの疫学研究で報告はあるが、イソニアジド耐性に関与するかどうかの実証はない遺伝子変異を持つ菌株と推定される。本研究でこれらの変異がイソニアジド耐性に関与するかどうかを明らかにする。疫学研究のデータも含めて既知のイソニアジド耐性の関与が疑われる遺伝子変異が全く検出されないイソニアジド耐性株(すでに2株存在)に関しては、RNA-seq解析による発現解析からイソニアジド耐性に関与する遺伝子発現系を絞り込んだ。

4. 研究成果

全国で分離された薬剤耐性結核菌254株の全ゲノム情報を解析し、その性状や分布、遺伝子系統、薬剤耐性に関与する遺伝子について解析した。これらの254株は5つのLineageに分類され、日本人と外国人の患者由来結核はそれぞれ異なる分布であった。イソニアジド (INH) 耐性結核は188株、リファンピシン (RFP) 耐性TBは12株、INHとRFPに耐性を示す多剤耐性結核は54株だった。これらの多剤耐性結核のうち、他の主要薬剤に耐性がある超多剤耐性結核は9株で、全ての株が日本人患者由来であった。現在これらの分子疫学の解析結果を下記の論文とし投稿・受理された(2021年6月)。

Mizukoshi F et al: Molecular Epidemiology of Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Japan, *mSphere*, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Fuminori Mizukoshi, Nobuyuki Kobayashi, Fumiko Kirikae, Ken Ohta, Kazunari Tsuyuguchi, Noritaka Yamada, Yoshikazu Inoue, Masahide Horiba, Noriko Kawada, Akiko Ichinose, Tohru Miyoshi-Akiyama, Reiko Kiritani, Keiji Funatogawa, Teruo Kirikae	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular Epidemiology of Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水越文徳、小林信之、切替富美子、切替照雄、船渡川圭次、桐谷礼子
2. 発表標題 薬剤耐性結核菌の全ゲノムを用いた分子疫学解析
3. 学会等名 第57回栃木県公衆衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林信之
2. 発表標題 次世代シーケンサーによる結核菌の全ゲノム解析を用いた薬剤耐性結核の診断および治療法の開発に関する研究
3. 学会等名 第2回NH0ネットワーク会議（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuyuki Kobayashi, Akiko Ichinose, Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae, Fuminori Mizukoshi, Jin Takasaki, Ken Ohta
2. 発表標題 Whole genome sequencing analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with drug-resistant tuberculosis in Japan
3. 学会等名 49th Union World Conference on Lung Health（国際学会）
4. 発表年 2018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
研究 分担者	竹本 訓彦 (Takemoto Norihiko) (40546793)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局 等・上級研究員 (82610)	

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