

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16066

研究課題名(和文)肺MAC症新規疾患感受性遺伝子の同定と解析

研究課題名(英文)Identification and analysis of a susceptibility gene for MAC pulmonary disease

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)：肺MAC症は、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いない。申請者らは、肺MAC症患者のケース・コントロール関連解析および再現解析を実施し、患者集団では健康者と比較して肺組織におけるA遺伝子の発現量が低下している可能性を見出した。培養細胞株にMAC菌を感染させて時間経過に伴うA遺伝子の発現量を調べたところ、感染後5時間で発現上昇が見られた。さらに、A遺伝子をノックダウンした細胞株を作成してMAC菌を感染させたところ、感染後3日で細胞内菌数が野生型と比較して増加していた。これらの結果から、A遺伝子の発現がMAC感染時における細胞内殺菌に必要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MAC症患者の急増により、その病態機構の解明と新たな診断方法および治療方法の開発が望まれている。我々の研究により、肺MAC症の発症と有意に関連する因子が見出され、本研究によりその再現性が確認された。さらに、培養細胞株を使用して、A遺伝子の発現がMAC感染における細胞内殺菌に必要であることを示唆する結果が得られた。将来的に、A遺伝子が関与するMAC感染・発症防御機構を明らかにすることができれば、得られた知見に基づいた新規治療薬の開発、肺MAC症のリスク診断やオーダーメイド治療といった新しい診断・治療法開発につながることも十分に期待でき、国民の公衆衛生に大きく貢献することが予想される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary Mycobacterium avium complex (MAC) disease is a chronic progressive lung disease. Although epidemiological data indicate potential genetic predisposition, its pathogenesis remains unclear. Conducting a genome-wide association study (GWAS), we previously found a susceptibility gene (hereafter referred to as gene-A) for pulmonary MAC disease. In this study, we confirmed reproducibility of our previous GWAS using independent set of Japanese patients with MAC. In a type II alveolar cell line, expression of gene-A was upregulated on 5 hours after infection with MAC. The gene-A knockdown cell line showed higher bacterial burden than wild-type cell line did on 3 days after infection with MAC. These results suggested that expression of gene-A is required for inhibiting intracellular growth of MAC.

研究分野：遺伝・ゲノム動態

キーワード：肺MAC症 疾患感受性遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌によって生じる疾病は結核、ハンセン病、および非結核性抗酸菌(NTM)症に分類される。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増加しており、本邦においてもその傾向は著しい。2014 年に本邦において実施された疫学調査から、肺 NTM 症の人口 10 万人当たりの罹患率は 14.7 と算出され、7 年前の調査から 2.6 倍に増加し、結核の罹患率(= 12.9)を上回ることが明らかになった(Namkoong H ら(2016))。しかしながら、NTM に効果的な抗菌薬はなく、現時点では肺 NTM 症の決定的な治療法が確立されていない。したがって患者数は蓄積し、重症者も増えてきているため、肺 NTM 症の病態解明と治療法の開発は急務である。

肺 *Mycobacterium avium complex* (MAC)症は本邦において肺 NTM 症の 89%を占め、全肺 NTM 症における肺 MAC 症の割合は欧米などの諸外国と比較してもきわめて高い(Morimoto K ら(2014), Hoefsloot W ら(2013))。本邦における肺 MAC 症の患者は、(1)中高年女性、(2)痩身、(3)非喫煙者に多く、その病変の多くは(4)中葉・舌区に局在し、(5)気管支拡張・小結節を伴うという特徴を示す。また、MACは弱毒菌でありながら免疫正常者に感染し発症する。これらの事実から、肺 MAC 症の発症には宿主側の因子が重要であると推測されてきた。日本人集団における肺 MAC 症の宿主側因子についてこれまでに、HLA 型、*NRAMP1* 遺伝子、および *MICA* 遺伝子が発症に関与することが示されてきたが(Takahashi M ら(2000), Kubo K ら(2000), Tanaka G ら(2007), Shojima J ら(2009))、報告は限られており未だ病態機構解明の途上にある。そこで本研究は、本邦における肺 MAC 症の疾患感受性遺伝子を網羅的に探索し、その解析結果より肺 MAC 症の病態機構の一端を明らかにすることにした。

肺 MAC 症の疾患感受性遺伝子の探索について、申請者は以下の予備的な研究結果を得ている。日本人かつ非血縁者の肺 MAC 症患者集団 418 例の DNA に対して、日本人ゲノムの解析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。同様の方法によって得られた非血縁健常者集団 419 例の SNP タイピング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。その結果、①肺 MAC 症の発症に有意に関連する新たな SNP が 1 つ見出された。続いて、この SNP と、近傍遺伝子の組織における発現量との相関(eQTL)を GTEx portal データベース(Lonsdale J ら(2013))により検証した。その結果、肺組織においてある遺伝子(以下、A 遺伝子とする)の発現量と相関しており、②上記関連解析により検出されたリスクアレルをホモで持つ個体では、A 遺伝子の発現量が低下している傾向にあることが分かった。さらに、SNP 間の連鎖不平衡の情報に基づいてジャポニカアレイでカバーされていない SNP の遺伝子型を推定する imputation 法により、③24 の SNP が新たに肺 MAC 症の発症に有意に関連するという結果が得られた。ジャポニカアレイおよび imputation 法により見出された 25 の SNP の機能情報を HaploReg データベース(Ward LD ら(2012))により検証したところ、④遺伝子発現を調節するエンハンサー機能をもつ SNP や、転写因子の結合部位と推定される SNP が含まれていた。以上の結果から申請者は、「日本人肺 MAC 症患者では肺組織において A 遺伝子の発現量が変化し、結果として MAC に対する殺菌能が低下することで発症している」と考え、本研究でこの仮説を検証する。A 遺伝子と肺 MAC 症の関連はこれまでに報告がなく、新規の疾患感受性遺伝子である可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、日本人集団の肺 MAC 症疾患感受性遺伝子を網羅的に探索し、肺 MAC 症の病態機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、

1. 日本人肺 MAC 症患者のケース・コントロール関連解析から新規の肺 MAC 症疾患感受性遺伝子を検出し、その再現性を確認すること
2. 培養細胞および哺乳類の生体内において、新規の疾患感受性遺伝子が MAC の殺菌機構に関与していることを証明すること

3. 研究の方法

(1) 独立の日本人肺 MAC 症患者集団を用いてケース・コントロール関連解析の結果の再現性を確認する。

予備的に行ったケース・コントロール関連解析および imputation 法により見出された SNP のうち 9 つの SNP について、上記ケース・コントロール関連解析とは独立した肺 MAC 症患者 591 例の末梢血単核球(PBMC)から DNA を抽出し、DigiTag2 法(Nishida N ら (2007))による SNP タイピングを行う。

(2) 培養細胞を用いて A 遺伝子と肺 MAC 症の関連を *in vitro* で解析する。

I. 培養細胞における A 遺伝子の発現レベルを定量化する。

ヒト II 型肺胞上皮細胞株 A549 およびヒト単球性白血病細胞株 THP-1 をホルボール 12-ミリスチート 13-アセタート(PMA)により分化させたマクロファージに対して、進行性肺 MAC 症患者より単離された *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* (MAH) TH135 株を MOI=200 で感染させ、数時間インキュベーションする。MAH TH135 感染細胞および対照とする MAH TH135 非感染細胞をそれぞれ回収し、リアルタイム PCR 法により A 遺伝子の mRNA

レベルを定量化する。

II. A 遺伝子をノックダウンした培養細胞における MAC の殺菌能の測定

A549 細胞株または THP-1 細胞株に対して、化学合成した shRNA により A 遺伝子の発現を抑制する(A549-KD, THP-1-KD)。A549-KD および THP-1-KD から分化させたマクロファージに対して MAH TH135 株を MOI=200 で感染させ、1 日および 3 日経過した時点で細胞を回収する。回収した細胞は、アミカシン(100 µg/ml)で 2 時間処理したのちに界面活性剤(Triton X-100)で 10 分間処理して連続希釈し、7H10 培地に塗布する。2-3 週間後に菌量をコロニー形成単位(CFU)として測定する。

(3) 遺伝子改変マウスを用いて A 遺伝子と肺 MAC 症の関連を *in vivo* で解析する。

A 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変マウスを作成する。C3H/HeN マウスおよび作成した C3H/HeN 背景の遺伝子改変マウスに対して、 10^7 CFU の MAH TH135 を気管挿管により肺に感染させる。統計解析を行うために、一群あたり 10-12 匹のマウスを使用する。マウスは感染後 10 日毎に殺処分し、肺組織のホモジネートを連続希釈して 7H10 培地に塗布する。2-3 週間後に菌量を CFU の形で測定し、両者を比較する。また、感染後 7 日毎に体重測定を行い、時間経過に伴う体重変化および生存時間解析を行う。

4. 研究成果

(1) 再現解析

本再現解析で検証した 9 つの SNP のうち、3 つの SNP について肺 MAC 症発症と有意な相関が見られ、ケース・コントロール関連解析の再現性を確認することができた。

(2) A 遺伝子と肺 MAC 症の関連：*in vitro* 解析

A549 細胞株または THP-1 細胞株より分化したマクロファージについて、MAH TH135 感染後時間経過にともなう A 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により測定した。A549 細胞株では、感染後 5 時間で A 遺伝子の発現が 5~8 倍に増加していた。また、THP-1 細胞株より分化したマクロファージでは感染後 5 時間で 1~2 倍に増加していた。続いて、A549 細胞株または THP-1 細胞株において、A 遺伝子を shRNA によりノックダウンした細胞株(A549-KD, THP-1-KD)を作成した。A549-KD では、野生型株と比べて、MAH TH135 株感染後 1 日の時点では細胞内菌数に差がみられなかったが、感染後 3 日では細胞内菌数が 3~5 倍に増加していた。一方で THP-1-KD では野生型と比較して有意な増加は認められなかった。これらの結果から、A 遺伝子の発現が MAC 感染時における肺細胞内の殺菌機構に関与している可能性が示唆された。

(3) A 遺伝子と肺 MAC 症の関連：*in vivo* 解析

CRISPR/Cas9 法により A 遺伝子ノックアウトした C3H/HeN 背景遺伝子改変マウスを作成したのちに、ヘテロ個体の交配によりホモ個体の作成を試みた。しかしながら、ホモ個体が得られる確率が想定よりも低く、ホモ個体数の維持に時間を要したため、本研究期間中に A 遺伝子ノックアウトマウスに対する MAH TH135 の感染実験を行うことができなかった。現時点では感染実験を行うために必要なホモ個体を確保できており、今後感染実験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitaoka N, Fukano H, Yoshida M, Miyamoto Y, Mori S, Ishii N, Ato M, Ohara N, Hoshino Y.	4. 巻 57(2)
2. 論文標題 Discrimination of <i>Mycobacterium leprae</i> and <i>Mycobacterium haemophilum</i> in clinical isolates/specimens by multiple PCR assay and prediction of drug susceptibility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Microbiol	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） 10.1128/JCM.01760-18	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, 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） 10.1093/femsle/fny266	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 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, Hoshino Y.	4. 巻 68(8)
2. 論文標題 <i>Mycobacterium shigaense</i> sp. nov., a slow-growing, scotochromogenic species, is a member of the <i>Mycobacterium simiae</i> complex.	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） 10.1099/ijsem.0.002845	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, Ogura Y, Kazumi Y, Mitarai S, Hayashi T, Hoshino Y.	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 Announc.	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） 10.1128/genomeA.00552-18	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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26425-1	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 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 <i>Mycobacterium montefiorensis</i> Isolated from Japanese Black Salamander (<i>Hynobius nigrescens</i>).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announc.	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) 10.1128/genomeA.00448-18	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, Asakura T, Hisatsune J, Hoshino Y.	4. 巻 9(10)
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Mycobacterium xenopi</i> JCM15661T, Obtained Using Nanopore and Illumina Sequencing Technologies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc.	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) 10.1128/MRA.01583-19	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田光範, 星野仁彦
2. 発表標題 ブルーリ潰瘍の原因菌 <i>Mycobacterium ulcerans</i> subsp. <i>shinshuense</i> の比較ゲノム解析.
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 マルチプレックスPCR用プライマー及びそれをもちいたMycobacterium abscessus complex 3亜種の鑑別.	発明者 星野仁彦, 吉田光範.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-097493	出願年 2017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

〔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
---------	---------