

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08312

研究課題名(和文)皮膚ブルーリ潰瘍原因菌のゲノム・エピゲノム比較解析、感染源搜索と新規治療薬開発

研究課題名(英文) Genomic and epidenomic analysis of bacteria causing Buruli ulcer

研究代表者

星野 仁彦 (Hoshino, Yoshihiko)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・室長

研究者番号：20569694

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)：10株以上のブルーリ潰瘍原因菌菌株について、次世代シーケンサー(NGS)を用いて全ゲノム核酸解析を行ってきた。分離菌は地域差があり、分離地域ごとに類似した菌種が固まっていることを見出した。8株のメチル化について、NGSを用いて解析を行った。アフリカ株とアジア株で全ゲノム領域において、メチル化の程度が異なることが示唆された。我々はマウスへの感染実験において、病原性が異なることを示しているが、この原因にメチル化の程度が関与している可能性を考え、より多くの菌株のメチル化解析を行なったところ、アフリカ株集団とアジア株集団での相違が明確化されたので、成果を論文としてまとめて発表する予定とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフリカ株とアジア株が異なることが示されつつあり、ブルーリ海洋に対する対策にも地域差を考慮する必要があることが示唆されつつあり、国際的疫学研究にもインパクトのある成果となりつつある。

研究成果の概要(英文)：By 2018, more than 10 strains of Bruli ulcer-causing bacteria have been analyzed for whole genome nucleic acids using next-generation sequencers (NGS). It was found that the isolates had regional differences, and similar species were solidified in each isolated region. Methylation status of 8 strains of bacteria causing Bruli ulcers was analyzed using NGS. It was suggested that the degree of methylation differed in the whole genome region between African and Asian strains. Although we have conducted infection experiments on mice with a unified background of African and Asian strains, average Nucleotide Identity shows that the pathogenicity is different. Considering the possibility that the degree of methylation may be involved in the 2020 fiscal year, the methylation of more strains was analyzed with NGS, and the differences between the African and Asian strain populations were clarified, so this result was scheduled to be presented collectively as a paper.

研究分野：抗酸菌感染症

キーワード：抗酸菌 ゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Buruli 潰瘍は西アフリカ諸国に患者が多いとされる、顧みられない熱帯病の一つであるが、日本やオーストラリアなどの温帯でも患者は存在する。原因菌は抗酸菌の *Mycobacterium ulcerans* と言われているが、アフリカ株と *M. shinshuense* と言われる日本株 (アジア株) が同等であるかどうかは不明である。

### 2. 研究の目的

我々はヒトにブルーリ潰瘍を生じる *M. ulcerans* と *M. shinshuense* という2種類の抗酸菌のゲノムレベルあるいはエピゲノムレベルの相違点を解析していく。ヒトに感染する *M. shinshuense* と魚類や両生類に感染するMPM(Mycobactone producing mycobacteria)とゲノムレベルでの相違という観点から、これら抗酸菌の菌側因子の解明を行う。次いで感染源を遮断すれば疾患の予防に繋がるとの観点から *M. shinshuense* の感染源対策を行う。最後に *M. shinshuense* に効果的である新 抗菌薬開発の共同研究を行う予定である。本研究において、我々は臨床経過や 薬剤感受性などの 臨床情報に含まれる表現型と全ゲノム解析による遺伝子型を比較することで、日本独自のブルーリ潰瘍原因菌の全容解明を目指す。さらに既存薬と機序の異なる新規抗酸菌薬開発を行い、ブルーリ潰瘍に対する新規治療法・治療薬の提案を行う。

### 3. 研究の方法

(1)日本固有のブルーリ潰瘍原因菌 *M. shinshuense* と他の MPM のゲノムレベル・エピゲノムレベルでの比較解析と病原性解析

現在 34 株の *M. shinshuense* 臨床分離株の培養に成功しているので、次世代シーケンサー(NGS)として Illumina 社 Mi-Seq を使用してこれらの全ゲノム解析情報を獲得する。その情報を利用して、SNP-based maximum-likelihood phylogenetic tree 法を使用して系統樹を作成する。患者情報や 薬剤感受性情報を利用して、phenotype-genotype 解析を行う。細菌にはヒストン構造はないので DNA メチル化の有無によってエピゲノム解析を行う。全臨床分離株のメチル化を MeME-ChIP 法を使用して検出し 解析する。

(2)日本のブルーリ潰瘍の感染源探索解析

日本でも患者数は増加しているので、研究期間中に新患者が発見される可能性は非常に高い。患者居住環境において感染源探索かいせ析を以下の通りを行う。聞き取り調査を詳細に行い感染時期の推定と感染源の推定を行う。また我々は疫学検査解析で、症例の多発地域を特定しているが、これらの地域における環境検体の採取を試みる。携帯型分析機器を使用してベッドサイドで、候補となる動物の毛や糞、虫から核酸抽出を行い、培養を行わずに検体を直接処理して 16S rRNA や IS2404 をターゲットとして PCR を行った後ゲノム解析を行う。

(3)日本のブルーリ潰瘍に対する新 治療法開発・治療薬かいは発

我々は日本のブルーリ潰瘍治療の臨床情報の聴取を完了しており、臨床での治療を検討し、使用薬剤に対する有効性を推定する。加えて nocardithiocin は、病原性放線 である *Nocardia pseudobrasiliensis* から分離・同定された thiopeptide 化合物で、多剤耐性結核菌にも有効である。nocardithiocin 生合成遺伝子クラスターを利用して *M. shinshuense* に効果のある新規治療薬剤作成を試みる。

#### 4. 研究成果

10株以上のブローリ潰瘍原因菌菌株について、次世代シーケンサー(NGS)を用いて全ゲノム核酸解析を行ってきた。分離菌は地域差があり、分離地域ごとに類似した菌種が固まっていることを見出した。8株のメチル化について、NGSを用いて解析を行った。アフリカ株とアジア株で全ゲノム領域において、メチル化の程度が異なることが示唆された。我々はマウスへの感染実験において、病原性が異なることを示しているが、この原因にメチル化の程度が関与している可能性を考え、より多くの菌株のメチル化解析を行なったところ、アフリカ株集団とアジア株集団での相違が明確化されたので、成果を論文としてまとめて発表する予定とした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yoshida M, Fukano H, Asakura T, Hisatsune J, Hoshino Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Mycobacterium xenopi JCM15661T, Obtained Using Nanopore and Illumina Sequencing Technologies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology resource announcements	6. 最初と最後の頁 0
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 -
1. 著者名 Fukano H, Hiranuma O, Matsui Y, Tanaka S, Hoshino Y.	4. 巻 0
2. 論文標題 The first case of chronic pulmonary Mycobacterium shigaense infection in an immunocompetent patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Microbes and New Infections	6. 最初と最後の頁 10630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmni.2019.10063	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 Tanaka S, Hoshino Y, Sakagami T, Fukano H, Matsui Y, Hiranuma O.	4. 巻 19
2. 論文標題 Pathogenicity of Mycolicibacterium phlei, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC infectious diseases	6. 最初と最後の頁 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-019-4050-z	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 Asakura T, Suzuki S, Fukano H, Okamori S, Kusumoto T, Uwamino Y, Ogawa T, So M, Uno S, Namkoong H, Yoshida M, Kamata H, Ishii M, Nishimura T, Hoshino Y, Hasegawa N.	4. 巻 6
2. 論文標題 Sitafloxacin-Containing Regimen for the Treatment of Refractory Mycobacterium avium Complex Lung Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open forum infectious diseases	6. 最初と最後の頁 ofz108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ofid/ofz108	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, Shouji M, Hatta S, Maruyama D, Izutsu K, Shiotsuka M, Ogura Y, Hayashi T, Hasegawa N, Iwata S, Hoshino Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Mycobacterium</i> sp. Strain NCC-Tsukiji, Isolated from Blood Culture of a Patient with Malignant Lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01575-18	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 Morimoto Kozo, Nakagawa Taku, Asami Takahiro, Izumi Kiyohiko, Hayashi Yuta, Matsuda Shuichi, Murase Yoshiro, Yano Ryoza, Takasaki Jin, Betsuyaku Tomoko, Aono Akio, Goto Hajime, Hoshino Yoshihiko, Kurashima Atsuyuki, Ato Manabu, Ogawa Kenji, Hasegawa Naoki, Mitarai Satoshi	4. 巻 145
2. 論文標題 Clinico-microbiological analysis of 121 patients with pulmonary <i>Mycobacteroides abscessus</i> complex disease in Japan ? An NTM-JRC study with RIT	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 14 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2018.10.012	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 Kitaoka Naoya, Fukano Hanako, Yoshida Mitsunori, Miyamoto Yuji, Mori Shuichi, Ishii Norihisa, Ato Manabu, Ohara Naoya, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Discrimination of <i>Mycobacterium leprae</i> and <i>Mycobacterium haemophilum</i> in Clinical Isolates and Specimens by Multiplex PCR Assay and Prediction of Drug Susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-3
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 Mitsunori, Nakata Noboru, Miyamoto Yuji, Fukano Hanako, Ato Manabu, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 365
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 Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fny266
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 Hanako, Yoshida Mitsunori, Kazumi Yuko, Fujiwara Nagatoshi, Katayama Kinya, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Miyamoto Yuji, Fujimoto Noriki, Hongsheng Wang, Mizumoto Chisaki, Koizumi Yusuke, Maeda Hiroyoshi, Hiranuma Osamu, Mitarai Satoshi, Ishii Norihisa, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 68
2. 論文標題 Mycobacterium shigaense sp. nov., a slow-growing, scotochromogenic species, is a member of the Mycobacterium simiae complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	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 Mitsunori, Fukano Hanako, Ogura Yoshitoshi, Kazumi Yuko, Mitarai Satoshi, Hayashi Tetsuya, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Mycobacterium shigaense	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 1-3
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 Kazue, Ogura Yoshitoshi, Toyoda Atsushi, Yoshida Mitsunori, Fukano Hanako, Fujiwara Nagatoshi, Miyamoto Yuji, Nakata Noboru, Kazumi Yuko, Maeda Shinji, Ooka Tadasuke, Goto Masamichi, Tanigawa Kazunari, Mitarai Satoshi, Suzuki Koichi, Ishii Norihisa, Ato Manabu, Hayashi Tetsuya, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Naturally occurring a loss of a giant plasmid from Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense makes it non-pathogenic	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8218
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 Hanako, Yoshida Mitsunori, Shimizu Akane, Iwao Hajime, Katayama Yukie, Omatsu Tsutomu, Mizutani Tetsuya, Kurata Osamu, Wada Shinpei, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Mycobacterium montefiorensis Isolated from Japanese Black Salamander (Hynobius nigrescens)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 1-3
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 Mitsunori, Fukano Hanako, Miyamoto Yuji, Shibayama Keigo, Suzuki Masato, Hoshino Yoshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Mycobacterium marinum</i> ATCC 927 T, Obtained Using Nanopore and Illumina Sequencing Technologies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00397-18	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 Aoki Ami, Sakagami Takuro, Yoshizawa Kazutaka, Shima Kenjiro, Toyama Mio, Tanabe Yoshinari, Moro Hiroshi, Aoki Nobumasa, Watanabe Satoshi, Koya Toshiyuki, Hasegawa Takashi, Morimoto Kozo, Kurashima Atsuyuki, Hoshino Yoshihiko, Trapnell Bruce C, Kikuchi Toshiaki	4. 巻 66
2. 論文標題 Clinical Significance of Interferon- Neutralizing Autoantibodies Against Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cid/cix996	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

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 星野 仁彦, 宮寺 浩子, 徳永 勝士, 永井 英明, 吉山 崇
2. 発表標題 結核菌抗原T cell epitope領域のHLA class II結合解析
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiko Hoshino
2. 発表標題 Cell-based Comprehensive and Systematic Binding Analysis Between HLA -DR or -DQ Regions and T Cell Epitopes of TB Antigens
3. 学会等名 アメリカ胸部疾患学会 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野 仁彦, 中田 登, 阿戸 学, 小椋 義俊, 林 哲也
2. 発表標題 ハンセン病治療薬clofazimine薬剤耐性機序の分子生物学的解明
3. 学会等名 第91回日本ハンセン病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深野 華子, 吉田 光範, 鹿住 祐子, 有川 健太郎, 岩本 朋忠, 星野 仁彦
2. 発表標題 地域特性を疑う新規同定抗酸菌Mycobacterium shigaenseの特徴とその感染源についての調査研究
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 拓, 朝倉 崇徳, 森本 耕三, 南宮 湖, 鈴木 翔二, 八木 光昭, 福井 保太, 林 悠太, 垂水 修, 山田 憲隆, 星野 仁彦, 倉島 篤行, 長谷川 直樹, 小川 賢二
2. 発表標題 肺Mycobacterium avium complex症に対する間欠的治療の検討 後ろ向き多施設共同研究
3. 学会等名 第93回日本結核病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野 仁彦, 永井 英明, 吉山 崇, 宮寺 浩子, 徳永 勝士
2. 発表標題 結核菌抗原T cell epitope領域のHLA class II結合解析
3. 学会等名 第93回日本結核病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 光範, 星野 仁彦, 宮本 友司, 小椋 義俊, 林 哲也, 石井 則久
2. 発表標題 ブルーリ潰瘍の原因菌Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuenseの比較ゲノム解析
3. 学会等名 第93回日本結核病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Murase, Rie R Yotsu, Mariko Mikami, Koichi Suzuki, Manabu Ato, Yoshihiko Hoshino, Masashi Akiyama, Norihisa Ishii
2. 発表標題 Buruli ulcer in Japan: update 2017-2018
3. 学会等名 WHO meeting on Buruli ulcer and other Skin NTDs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野仁彦
2. 発表標題 非結核性抗酸菌症と結核～疫学と微生物学から～
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会・第16回日本小児がん看護学会学術集会・第23回公益財団法人がんの子どもを守る会公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野仁彦
2. 発表標題 非結核性抗酸菌症研究の最近の潮流
3. 学会等名 第101回日本細菌学会関東支部総会(招待講演)
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	深野 華子  (Fukano Hanako)  (40807541)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・ 研究員   (82603)	
研究 分担者	酒井 香奈江  (Sakai Kanae)  (60599447)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教   (14501)	
研究 分担者	吉田 光範  (Yoshida Mitsunori)  (70772630)	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   (82603)	

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