

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2022

課題番号：20KK0216

研究課題名（和文）機能ゲノム解析による肺MAC症の感染予防・病態予知・薬剤標的基盤の確立

研究課題名（英文）Expanding functional genomics of nontuberculous mycobacteria for establishing strategies for prevention, predictive diagnosis and drug development

研究代表者

立石 善隆（Yoshitaka, Tateishi）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30433296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：肺MAC症患者由来臨床菌株に対して、トランスポゾンシーケンシングを行い、臨床菌株で必須性の高まっている遺伝子を見出した。遺伝子必須性の高まっていた糖新生系、type VII secretion system、鉄硫黄クラスターの遺伝子発現を抑制した場合、臨床菌株において菌の増殖が抑制されることを証明した。さらに、臨床菌株感染マウス生体内における生体感染必須病原遺伝子群が、実験室株の低酸素静置バイオフィルム形成に必須となる遺伝子群と共通していた。本研究成果は、臨床菌株に対して有効な治療薬を開発するうえで、重要な基盤情報となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、非結核性抗酸菌マイコバクテリウム・イントラセルラーエについて、ゲノム型の異なる患者由来臨床菌株に対して、トランスポゾン（動く遺伝子）による変異株ライブラリーの作成と次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンシングを組み合わせたトランスポゾンシーケンシングを行い、複数の臨床菌株に共通した薬剤標的となる遺伝子群の同定を行いました。今回同定した遺伝子群は、非結核性抗酸菌臨床菌株の薬剤標的となるため、肺MAC症に対する新しい治療薬の開発において貴重な情報源となります。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have performed TnSeq of 8 Mycobacterium intracellulare clinical strains and compared the gene essentiality between clinical strains and the type strain ATCC13950. Gene essentiality was increased in the genes of gluconeogenesis, type VII secretion system and cysteine desulfurase. The bacterial growth was inhibited by suppressing the expression of these genes. The genes required for mouse infection in clinical strains partially shared the genes required for hypoxic pellicle formation in ATCC13950. These findings provide functional genomic information for drug discovery and novel insight into the favorable adaptation to hypoxia in clinical strains.

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌 肺MAC症 病原因子 代謝パスウェイ解析

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌は結核菌と異なり、水系・土壌等の自然界に常在する菌であるが、ヒトの気道を通じて肺に感染し、慢性難治性の呼吸器感染症を引き起こす。代表的な非結核性抗酸菌である MAC 菌 (*Mycobacterium avium-intracellulare complex*) は、元来、AIDS 患者などに対する日和見感染症の病原体として認識されてきた。しかし、近年の疫学データが示すように、肺 MAC 症は本邦のみならず米国を含めて世界的に増加している。MAC 菌は、結核菌と異なり、イソニアジドを中核とした既存の抗結核薬が効きにくく、かつ病態進行に寄与する病原因子も未知である。したがって、ヒトに対する感染を引き起こす責任因子を同定し、感染予防策確立ならびに診断・治療薬開発の基盤構築が国際的な喫緊課題である。

これまで我々は、外来遺伝子獲得能やバイオフィーム形成などの難治化病態に係る MAC 菌の細菌学的特性を解明してきた。今回、米国ミネソタ大学との共同研究により、病態進行症例と安定症例に分類された臨床 MAC 菌株を対象として、申請者が誌上発表した MAC 菌に対するゲノムワイドな必須遺伝子の同定 (Tateishi Y. Sci Rep. 2020;10:5449) により、臨床菌株に特有な病原因子、および病原性発現に必須となる代謝経路を解明し、肺 MAC 症の病態形成の責任因子を同定することを計画した。

2. 研究の目的

我々は、非結核性抗酸菌に対して、トランスポゾン変異を導入し、次世代シーケンシングによりトランスポゾン挿入リード数を産出することで、ゲノムワイドな必須代謝経路を同定するトランスポゾンシーケンシング (TnSeq) を構築した。本研究の目的は、TnSeq により、臨床菌株に特有な病原因子、および病原性発現に必須となる代謝経路を解明し、肺 MAC 症の病態形成の責任因子を同定することとした。そして、臨床菌株と実験室株間で相違の見られる病原因子を同定し、同定した病原因子に対する遺伝子発現抑制株を使った病原性発現効果の検証を行うこととした。

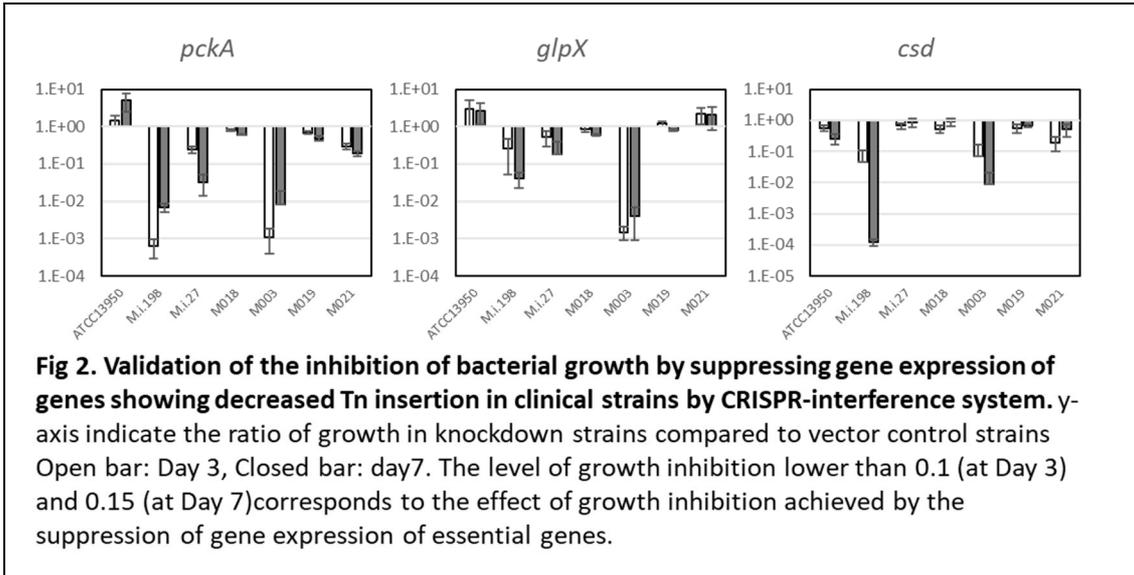
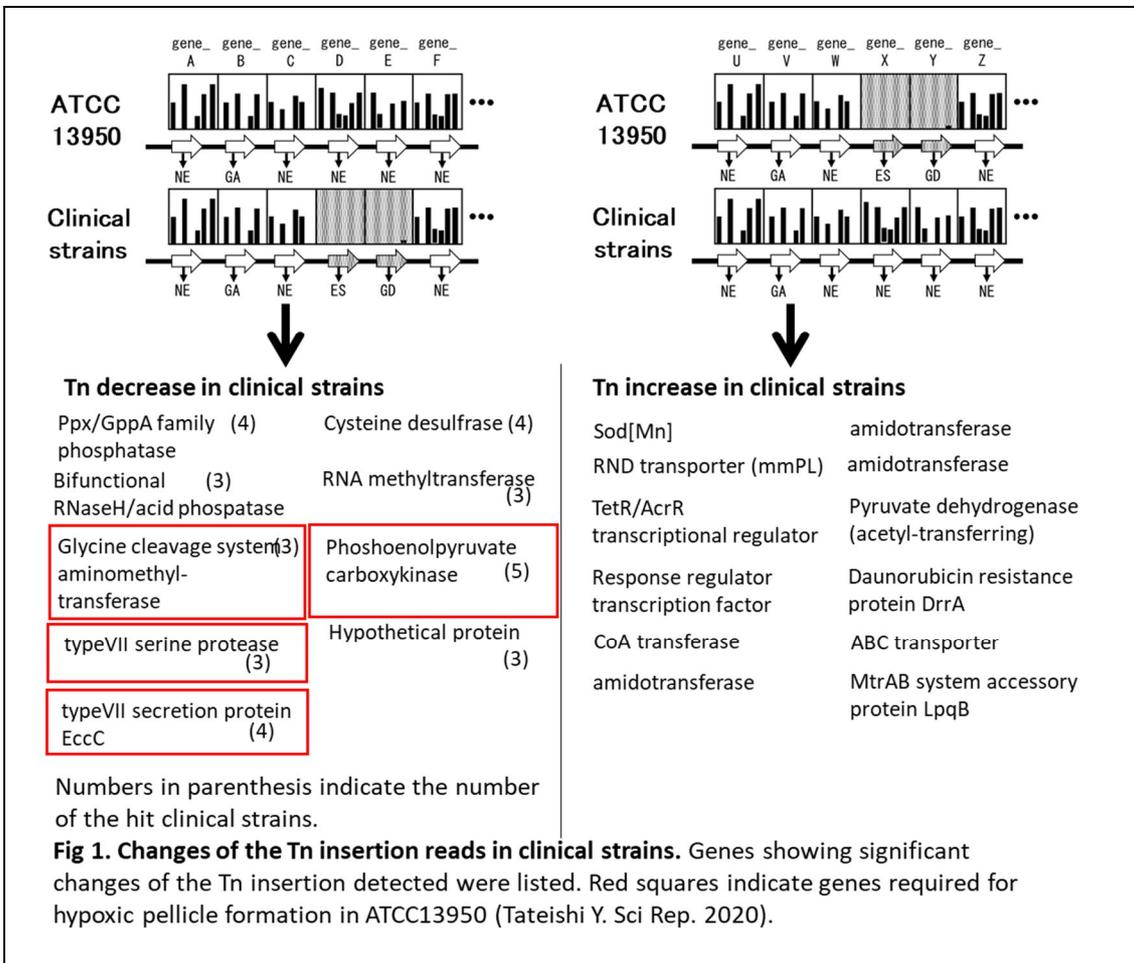
3. 研究の方法

2020 年度、肺 MAC 症臨床株の比較ゲノム解析を行い、*Mycobacterium intracellulare* 臨床菌株は、typical *M. intracellulare* 群と *M. paraintracellulare*-*M. indicus pranii* 群に大別され、脂質代謝 (fadE3, fadE33)、トランスポーター (mce3)、type VII 分泌装置 (ESX-2 system) などの菌株間の多様性に寄与する遺伝子群が存在することを明らかにした (Tateishi Y. BMC Microbiol. 2021;21:103)。このようなゲノム多様性をもつ臨床菌株に対して有効な薬剤標的を見出すため、臨床菌株 8 株 (進行例 3 株、安定例 4 株) について、トランスポゾン変異ライブラリーを作製した。そして、変異ライブラリー株から、ゲノム DNA を抽出し、TnSeq を行い、各菌株における生存必須遺伝子を同定した。2020 年に申請者が誌上発表した実験室株 (ATCC13950) の生存必須遺伝子 (Tateishi Y. Sci Rep. 2020;10:5449) と比較して、臨床株で遺伝子必須性の増加した遺伝子を検出した。同定した病原因子に対する遺伝子発現抑制株を用いた増殖抑制効果の検証を行った。

さらに、マウスに対して病原性を示す臨床菌株 (高病原性菌株、中等度病原性菌株) について、変異ライブラリー株をマウスに経気管投与で感染させ、マウス生体内における生存必須遺伝子を同定した。

4. 研究成果

Mycobacterium intracellulare 臨床菌株における生存必須遺伝子をトランスポゾンシーケンシング (TnSeq) により探索し、臨床菌株と ATCC 株との間で遺伝子必須性の相違を比較した。臨床菌株において、糖新生系および type VII secretion system の遺伝子必須性が増加し、輸送系遺伝子や二成分制御系遺伝子、解糖系の遺伝子必須性が減少していることが分かった (Fig 1)。CRISPR 干渉系を用いた遺伝子発現抑制株において、糖新生系、type VII secretion system、鉄硫黄クラスターの遺伝子発現を抑制した場合、臨床菌株において、菌の増殖抑制効果がみられた (Fig 2)。Type strain と同様、臨床菌株においても低酸素条件において、菌膜型バイオフィームを形成した。さらに、低酸素条件下において、臨床菌株の多くが type strain に比べて早い時期に対数増殖に入ることが証明され、臨床菌株における低酸素適応性の高さが示された。さらに、高病原性菌株と中等度病原性菌株において、臨床菌株感染マウス生体内における生体感染必須病原遺伝子を同定した。これらの遺伝子群は、実験室株の低酸素バイオフィーム形成に必須となる遺伝子群と共通していたことから、遺伝子必須性の面で低酸素環境に適応することで病原性を発現している可能性が示唆された (Fig 3)。



(A) Intermediate Hypervirulent (B) Intermediate Hypervirulent

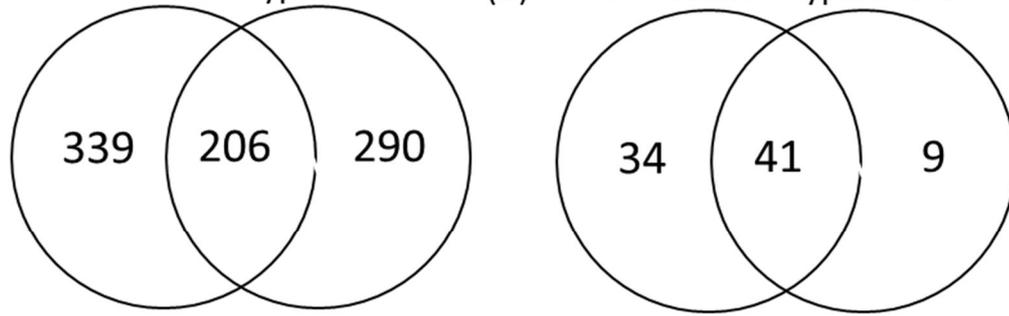


Fig 3. Sharing the genes required for mouse infection and biofilm formation. (A) Number of genes required genes for mouse infection both in hypervirulent and intermediate virulence strains. (B) Number of genes required both for mouse infection and biofilm formation. Genes required for biofilm formation were derived from the data of ATCC13950.

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 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nishiuchi Y, Tateishi Y, Hirano H, Ozeki Y, Yamaguchi T, Miki M, Kitada S, Maruyama F, Matsumoto S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Attachment with Erythrocytes Augments Extracellular Growth of Pathogenic Mycobacteria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Spectr.	6. 最初と最後の頁 e0245421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02454-21.	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 Ishikawa S, Ozeki Y, Suga S, Mukai Y, Kobayashi H, Inouchi E, Kaboso SA, Gebretsadik G, Dewi DNSS, Nishiyama A, Tateishi Y, Takihara H, Okuda S, Yoshida S, Misawa N, Matsumoto S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Monitoring IgG against Mycobacterium tuberculosis proteins in an Asian elephant cured of tuberculosis that developed from long-term latency.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08228-7.	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 Abe T, Hakamata M, Nishiyama A, Tateishi Y, Matsumoto S, Hemmi H, Ueda D, Sato T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification and functional analysis of a new type of Z,E-mixed prenyl reductase from mycobacteria.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS J.	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） 10.1111/febs.16412.	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 Ilinov A, Nishiyama A, Namba H, Fukushima Y, Takihara H, Nakajima C, Savitskaya A, Gebretsadik G, Hakamata M, Ozeki Y, Tateishi Y, Okuda S, Suzuki Y, Vinnik YS, Matsumoto S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Extracellular DNA of slow growers of mycobacteria and its contribution to biofilm formation and drug tolerance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90156-z.	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 Tateishi Y, Ozeki Y, Nishiyama A, Miki M, Maekura R, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Matsumoto S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Comparative genomic analysis of Mycobacterium intracellulare: implications for clinical taxonomic classification in pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare complex disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiol.	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-021-02163-9.	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 Oh S, Libardo MDJ, Azeza S, Pauly GT, Roma JSO, Sajid A, Tateishi Y, Duncombe C, Goodwin M, Ioerger TR, Wyatt PG, Ray PC, Gray DW, Boshoff HIM, Barry CE 3rd.	4. 巻 7
2. 論文標題 Structure-Activity Relationships of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-ones as Antitubercular Agents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 479-492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.0c00851. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33405882; PMCID: PMC7887755.	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 Hakamata M, Takihara H, Iwamoto T, Tamaru A, Hashimoto A, Tanaka T, Kaboso SA, Gebretsadik G, Ilinov A, Yokoyama A, Ozeki Y, Nishiyama A, Tateishi Y, Moro H, Kikuchi T, Okuda S, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Higher genome mutation rates of Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis during human infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75028-2. PMID: 33093577; PMCID: PMC7582865.	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 立石善隆
2. 発表標題 結核・非結核性抗酸菌における バイオフィルム
3. 学会等名 第35回日本バイオフィルム学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石善隆、西山晃史、尾関百合子、松本壮吉.
2. 発表標題 Mycobacterium intracellulare臨床菌株の比較ゲノム解析による類縁菌種との異同およびゲノム多様性についての検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石善隆、西山晃史、尾関百合子、松本壮吉
2. 発表標題 Mycobacterium intracellulare菌株間における生存必須遺伝子プロファイルの比較
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立石善隆、尾関百合子、西山晃史、松本壮吉
2. 発表標題 Comparative genomic analysis of M. intracellulare clinical strains.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石善隆、港雄介、西山晃史、尾関百合子、松本壮吉.
2. 発表標題 ransposon sequencingによる非結核性抗酸菌の生存必須遺伝子とバイオフィルム形成必須遺伝子の検出.
3. 学会等名 第34バイオフィルム学会、第57日本細菌学会中部支部会.
4. 発表年 2020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	港 雄介 (Minato Yusuke) (10836620)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究 分担者	森重 雄太 (Yuta Morishige) (40765608)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部 結核菌情報科・研究員 (82801)	

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