

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19637

研究課題名（和文）TnSeqを駆使した肺MAC症薬剤感受性判定の迅速化と治療薬の革新的選択法の開発

研究課題名（英文）Development of rapid diagnosis of drug sensitivity and optimal choice of chemotherapeutic regimen in MAC pulmonary disease by making use of TnSeq

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺MAC症に対するトランスポゾン変異株の作製とTnSeqによる迅速感受性診断法を開発することを計画した。TnSeqにより、抗結核薬の標的遺伝子である、ニューキノロン、エタンブロール、イソニアジド、サイクロセリン、リファンピシンの標的遺伝子が挙がった。さらに、ベダキリン標的遺伝子、現在開発中の薬剤標的glcB（リンゴ酸合成酵素）、type VII分泌装置遺伝子群（eccC, eccB, eccB）も生存必須遺伝子として挙がった。生存必須遺伝子を標的とした薬剤単剤および併用療法の生体内効果を感染マウスモデルで検証した。これにより生体内治療効果判定手法を確立し、誌上発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺MAC症患者由来の臨床菌株を使ったトランスポゾンシーケンシング（TnSeq）により、現行治療薬の標的以外にも肺MAC病原体の治療標的が存在することが分かりました。今回の結果は、肺MAC症の新規治療法を開拓するための薬剤標的データベースとなります。

また、感染マウスモデルを使った生体内での治療効果判定手法を確立しました。これにより、将来開発される薬剤に対する生体内治療効果判定が可能となります。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of developing the rapid diagnosis of drug sensitivity and optimal choice of chemotherapeutic regimen in MAC pulmonary disease, we have performed transposon sequencing of 7 clinical MAC strains and identified the common essential genes among the clinical strains. We identified genes of malate synthase (glcB) and type VII secretion system (eccC, eccB, eccB) as common essential genes, as well as genes of constitutive drug targets such as gyrA-gyrB, topA, embB, atpA-atpG-atpD, inhA, alr and rpoC.

We have analyzed the effect of monotherapy and combination therapy for mice infected with the high virulence strain. Clarithromycin-containing chemotherapy showed the highest efficacy. We could establish the mouse model of MAC pulmonary disease for evaluating in vivo drug sensitivity.

研究分野：細菌学

キーワード：非結核性抗酸菌症 トランスポゾン 次世代シーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺 MAC 症は、結核を凌ぐ罹患率と有病率(人口 10 万対 15 および 228)となり、診断・治療法の確立が急務である。現行の治療ではクラリスロマイシンに抗結核薬を加えた多剤併用療法が施行されるが、治療に抵抗し最悪死に至る症例も存在する。このことから、症例ごとに感受性の高い薬剤を選択して治療を行うテーラーメイド化学療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

我々は、肺 MAC 症病原菌に対して、トランスポゾン(動く遺伝子)によるゲノム全体を網羅する変異株の作製と、次世代シーケンサーによる網羅的解析を組み合わせた「トランスポゾンシーケンシング(TnSeq)」の手法を構築した(Tateishi Y. Sci Rep. 2020)。TnSeq は、DNA 量 200 ng の微量検体でも実施できる。このことから、肺 MAC 症喀痰検体を材料として、TnSeq による肺 MAC 症病原菌の迅速薬剤感受性判定法を開発することを計画した。

3. 研究の方法

肺 MAC 症進行例 3 例および緩徐例 4 例から採取した検体について、寒天培地植菌を経ずに TnSeq を行う場合と、寒天培地植菌を経ずに TnSeq を行う場合とで、生存必須遺伝子同定の精度を比較した。そして、生存必須遺伝子プロファイルのデータに基づき、マウス経気管投与による感染実験により、病態改善効果を検討することで、TnSeq に基づいた治療の有効性を検証した。

4. 研究成果

今回、臨床経過の異なる肺 MAC 症患者由来の *M. intracellulare* 臨床菌株(進行例 3 株、安定例 4 株)に対して、トランスポゾンシーケンシング(TnSeq)を実施した。寒天培地への植菌を経ずに直接 DNA を採取する方法は、実験結果が不安定であったため、寒天培地への植菌を経て変異株ライブラリーを作製してから DNA を抽出する定石通りの方法で実験を進めた。TnSeq で同定した臨床菌株共通の生存必須遺伝子として、抗結核薬の標的遺伝子である、*gyrA-gyrB* および *topA*(ニューキノロンの標的遺伝子)、*embB*(エタンプトールの標的遺伝子)、*inhA*(イソニアジドの標的遺伝子)、*alr*(サイクロセリンの標的遺伝子)、*rpoC*(リファンピシンの標的遺伝子)が挙がってきた(表 1)。イソニアジドは肺 MAC 症に対する臨床の有効性に乏しいが、薬剤標的としては有効であることが示された。さらに、*atpA-atpG-atpD*(ベダキリンの標的遺伝子)、新規抗結核薬として研究が進められている薬剤標的 *glcB*(リンゴ酸合成酵素) type VII 分泌装置を構成する遺伝子群(*eccC*, *eccB*, *eccB*)も臨床菌株共通の生存必須遺伝子として挙がってきた。共通生存必須遺伝子プロファイルに基づいた薬剤の組み合わせとして、エタンプトール+ニューキノロン+ベダキリン+リファンピシン(あるいはその他のリファマイシン系薬剤)の有望性が示唆された。

現行の治療薬の標的が生存必須遺伝子として同定されたことから、*in vivo* 治療効果手法の確立を視野に入れ、リファンピシン、エタンプトール、クラリスロマイシン、アミカシン各単剤、およびリファンピシン+エタンプトール+クラリスロマイシン、リファンピシン+エタンプトール+クラリスロマイシン+アミカシンの多剤併用療法群との間で治療効果を検討した。その結果、クラリスロマイシン単剤、あるいはクラリスロマイシンを含む多剤併用療法で最も肺内菌数減少・炎症改善効果が強かった(Fig 1)。一方、リファンピシン単剤では、肺内菌数は減少せず、イソニアジドとリファンピシンを含んだ結核治療初期におこる「初期増悪」に類似した炎症増強効果を認めた。

本研究により、現行治療薬の標的以外にも肺 MAC 症病原菌の治療標的が存在すること、ならびに感染マウスモデルを使った *in vivo* での治療効果の判定法を確立できたことから、誌上発表を行った(Tateishi Y. BMC Microbiol. 2023;23(1):94)。

表1. 臨床菌株共通生存必須遺伝子の例.

A. 現存治療薬の標的と一致した遺伝子

遺伝子	機能	既存薬剤
<i>rpoB</i>	RNAポリメラーゼ	リファンピシン(RFP)
<i>embABC</i>	アラビノガラクトタン合成	エタンブール(EB)
<i>rrl, rrs</i>	50SリボゾームRNA	クラリスロマイシン(CAM)
<i>rrl, rrs</i>	30SリボゾームRNA	ストレプトマイシン (SM)
<i>gyrA, gyrB</i>	DNAジャイレース	レボフロキササンシン (LVFX)
<i>inhA</i>	エノイルACP還元酵素	イソニアジド(INH) /エチオナミド(ETH)
<i>alr</i>	アラニンラセマーゼ	サイクロセリン(CS)

B. 新規治療薬および未開発の治療標的と一致した生存必須遺伝子

遺伝子	機能	新規薬剤
<i>atpE</i>	ATP合成酵素	ベダキリン (BDQ)
<i>eccB, eccC</i>	抗酸菌特有の膜輸送タンパク	未開発
<i>sufB, sufC, sufD</i>	鉄硫黄クラスター合成	未開発
<i>glcB</i>	リンゴ酸合成	未開発
<i>glgE</i>	細胞壁グルカン合成	未開発
<i>pbpB</i>	ペプチドグリカン合成	未開発
<i>gltB, trpA, hisC1, hisD</i>	アミノ酸合成 (グルタミン酸、ヒスチジン、トリプトファン)	未開発

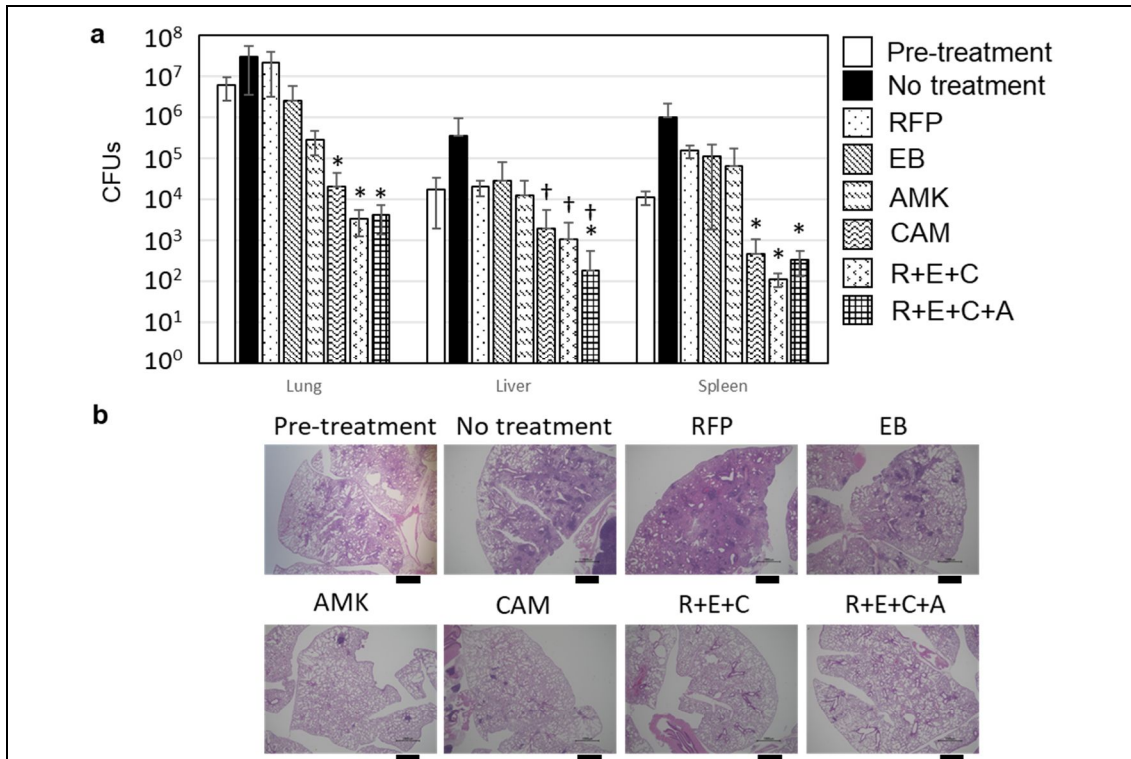


Fig 1. Effect of chemotherapy in M019-infected mice. **(a)** Comparison of the bacterial load before and after chemotherapy. At 4 weeks after infection, mice were divided into seven groups depending on the type of treatment. Data represent the mean \pm SD of CFUs per organ. *: significantly different compared with AMK at 8 weeks after infection, †: significantly different compared with RFP at 8 weeks after infection. **(b)** Histological images of the lungs of M019-infected mice in each treatment group. Bars indicate 1 mm. *: significantly higher compared with before chemotherapy and the no-treatment group, †: significantly lower compared with before chemotherapy and the no-treatment group.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5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 <i>Mycobacterium intracellulare</i> : implications for clinical taxonomic classification in pulmonary <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> 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 -

[学会発表] 計3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 <i>Mycobacterium intracellulare</i> 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 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 <i>Mycobacterium intracellulare</i> 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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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