

# 肺非結核性抗酸菌症患者の宿主疾患感受遺伝子の機能解析

南宮 湖

慶應義塾大学医学部 感染症学教室

## 【研究の背景】

肺非結核性抗酸菌 (NTM) 症は主に中高年以降のやせ形の女性や既存肺疾患のある患者に好発する難治性の慢性進行性呼吸器感染症である。非結核性抗酸菌 (NTM) 症は結核菌群・らい菌以外の抗酸菌による感染症であり、主に中高年以降の女性や既存肺疾患のある患者に難治性の慢性進行性呼吸器感染症を引き起こす。研究代表者は、厚生労働科学研究委託事業「非結核性抗酸菌症の疫学・診断・治療に関する研究」の一環として、本邦では ①肺 NTM 症の罹患率は 7 年間で約 2.6 倍と急激に増加し、②肺結核の罹患率を超え、③肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症が肺 NTM 症の約 90% を占めることを報告し、公衆衛生上、重要な感染症であることを明らかにした (Namkoong H, et al. *Emerg Infect Dis*, 2016) (図 1)。2020 年には日本において、肺 NTM 症の死亡者数は結核の死亡者数を凌駕した。世界的にも肺 NTM 症による死亡者数が増加傾向にあり (Zhou Y, et al. *BMJ Open*, 2012)、本疾患への包括的対策に対する社会的重要性が国際的にも益々高まっている。

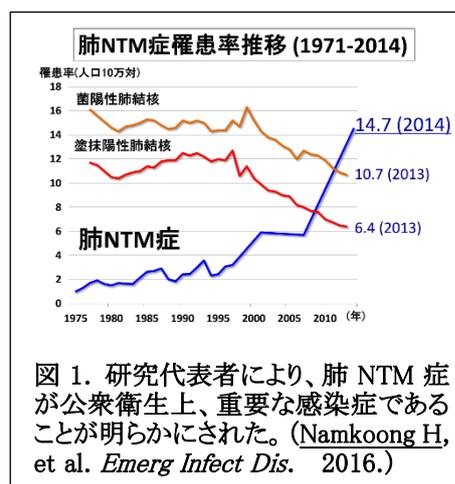


図 1. 研究代表者により、肺 NTM 症が公衆衛生上、重要な感染症であることが明らかにされた。(Namkoong H, et al. *Emerg Infect Dis*. 2016.)

しかし、抗菌薬治療による効果は限られ、新たな治療戦略が求められている。申請者は、肺 NTM 症の日本における疫学を明らかにするだけでなく、多施設共同研究を通じて肺 MAC 症のゲノムワイド関連解析 (GWAS) を世界で初めて実施し、疾患感受性遺伝子 CHP2 を明らかにした。さらに、自ら主導した国際共同研究により CHP2 が集団を超えて疾患感受性遺伝子になることを報告した。

## 【目 的】

そこで、本研究では CHP2 が気道上皮細胞に発現し、肺 MAC 症においては CHP2 の発現が低下していることに注目し、独自の気道上皮細胞培養系を駆使し、Chp2 の Knockout・Transgenic マウスを作成して疾患感受性遺伝子の機能解析を行うこと、さらに拡大したコホートを用いて GWAS を実施することにより肺 NTM 症/肺 MAC 症の新たな治療戦略を創出することを目的とする。

## 【方 法】

### 1. ヒト切除肺検体における CHP2 発現細胞の同定

CHP2 は single cell RNAseq のデータベースからは、クラブ細胞や杯細胞等の気道上皮細胞発現を認めている。切除肺検体を用いて、さらに詳細な発現細胞を同定する。

### 2. in vitro モデル、特にヒト気道上皮細胞を用いた検証

健康者由来及び肺 NTM 症由来のヒト初代鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞を conditionally reprogrammed cell with Y-

27632(CRC-Y)法(Gentzsch M et al, AJRCMB. 2017)を用いて培養・増殖する。鼻腔上皮は鼻腔スワブ、中枢・末梢気道上皮細胞は外科切除肺もしくは気管支鏡由来擦過細胞検体から取得し、効率よく増殖・保存可能である。これまで既に複数の健常者由来の細胞を保存している(倫理委員会承認番号: 20180051)。具体的には、培養前に得られる細胞数は 100-200 万(1M-2M) cell 程度であるが、上記 CRC-Y 法で feeder 細胞(3T3J2 cell)と 10cm dish で共培養することで 10M-15M cell に増殖し、保存できる。増殖したこれらの細胞を、気相液相界面培養(Air liquid interface: ALI)することで線毛細胞を含むヒト気道上皮細胞として使用する。

### 3. MAC 感染マウスモデル肺における検討

Chp2Tg マウス・Chp2KO マウス・対照マウスを用いて、MAC 感染モデルマウスを作製する。MAH104 株・TH135 株・臨床分離株を感染させ、A 生存率、B 体重推移、C 肺内 CFU、D 脾臓細胞中 CFU、E 画像評価(micro CT による測定)、F 病理像、G 肺胞洗浄液中の各種サイトカイン発現量、H 全肺における各種免疫担当細胞の表面マーカーの発現(マウス肺をリベラーゼ及び DNase により単細胞とし、各種表面マーカー抗体で染色後、FACS で評価)を比較検討し、MAC 感染モデルマウスにおける Chp2 の役割を検討する。

## 【結 果】

ヒト切除肺検体以外に、ヒト気道上皮細胞及び単球系細胞で CHP2 発現を確認した。また、シングルセル解析においても杯細胞を含む気道上皮細胞での発現が確認され、CHP2 が主に気道上皮において特異的に発現していることを明らかにした。

また、in vitro モデルの構築に成功したヒト気道上皮細胞を用いて、MAC 感染(MAH104 株)をさせた。さらに、CHP2 を過剰発現させた気道上皮細胞株で MAH104 株(M. avium 標準株)の細胞内感染を確認した。

MAC 感染マウスモデルでは、Chp2KO/Tg マウスを作成できた、感染モデルを作成できた。また、通常マウスを用いて、肺臓器において、感染させ、病理像でも感染及び炎症像を確認できた。

## 【考 察】

CHP2 は主に気道上皮細胞に特異的に発現し、ヒト切除肺検体や気道上皮細胞、単球系細胞での発現が確認された。また、in vitro モデルにおいて MAC 感染時の細胞内感染が示され、CHP2 過剰発現により感染制御が可能であることが示唆された。さらに、MAC 感染マウスモデルにおいても感染や炎症像が確認され、CHP2 の役割が明らかとなった。これらの結果から、CHP2 は MAC 感染制御における有望な分子であり、新規治療標的としての可能性を有すると考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

肺 NTM 症は患者数が急増する呼吸器感染症であり、その治療は数年に及び、複数の抗菌薬の内服を要し、キードラッグであるマクロライド系抗菌薬に耐性を獲得すると、難治化し死亡に至る(Morimoto K, Namkoong H et al, Ann ATS. 2016)。日本では NTM による死亡者数は既に結核の死亡者数を大きく凌駕している。

欧米において肺 NTM 症が合併症として致命的になる嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis;CF)に対して、宿主因子をターゲットにした新薬(Middleton, et al. NEJM. 2019)の登場により、CF 患者における抗生剤使用を顕著に減少させ、多剤耐性菌をも減少させたことから(Miller, et al. Clin Infect Dis. 2022)、宿主因子への介入は AMR の観点からも臨床的意義が大きい。近年、ゲノム創薬が注目され、GWAS のデータから判明した遺伝子が低分子医薬品や抗体医薬品等の創薬の可能性があると注目され、感染症創薬の観点からも本研究の意義は大きい(Sanseau P, et al. Nat Biotech 2012)。

## 【参考・引用文献】

- Namkoong H, et al. Emerg Infect Dis, 2016  
Zhou Y, et al. BMJ Open, 2012  
Gentzsch M, et al. AJRCMB, 2017  
Morimoto K, Namkoong H, et al. Ann ATS, 2016  
Middleton PG, et al. NEJM, 2019  
Miller MR, et al. Clin Infect Dis, 2022  
Sanseau P, et al. Nat Biotech, 2012