

家族性に発症する肺非結核性抗酸菌症の疾患感受性遺伝子同定とその機能解析

永寿総合病院呼吸器内科

医員 南宮 湖

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター

東京大学人類遺伝学教室

国立感染症研究所感染制御部第6室

慶應義塾大学医学部感染制御センター

東京大学農学部実験動物学研究室

教授 小崎 健次郎

教授 徳永 勝士

室長 星野 仁彦

教授 長谷川 直樹

准教授 角田 茂

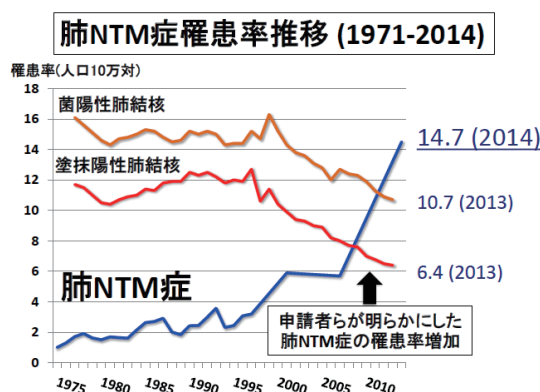
はじめに

1 研究代表者が明らかにした本邦における肺非結核性抗酸菌症の罹患率増加の実態

肺非結核性抗酸菌（NTM）症は、主に中高年以降の女性に好発する難治性の慢性進行性呼吸器感染症であり、近年、本邦で急激な増加が指摘されている。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、①肺NTM症の罹患率は7年前と比較して、約2.6倍と急激に増加していること、②肺NTM症の罹患率は肺結核の罹患率を超えたことを示し（Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, Mitarai S. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. Emerg Infect Dis. 2016 Jun; 22 (6) :1116-7:1）、肺NTM症が公衆衛生上、重要な呼吸器感染症であることを明らかにした（右図参照）。また、各種マスメディアにも取り上げられ、社会的に大きな注目を浴びた（右図）。

2 肺NTM症の疾患感受性遺伝子が存在する可能性

肺NTM症は軽快・増悪を繰り返し、徐々に進



結核類似菌の患者急増

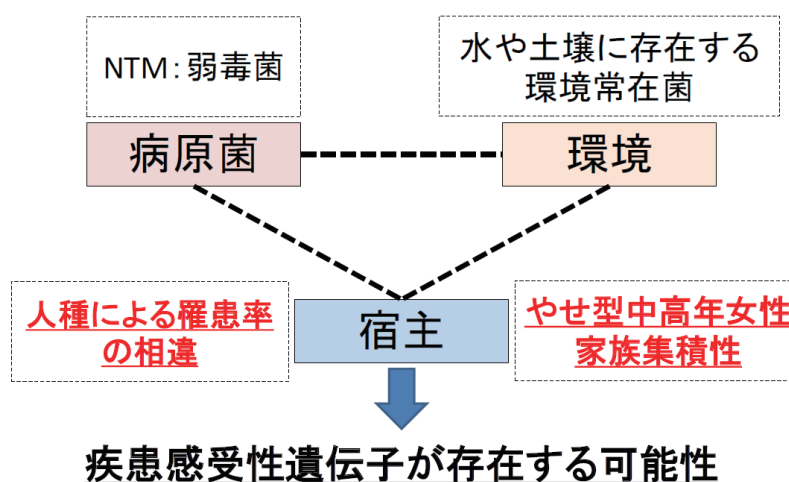
呼吸器系、7年で2.6倍

結核菌の仲間細菌による症状が出て死に至る例も出てくる呼吸器系の病気である。推定で年間13000人が死亡している。「肺非結核性抗酸菌症」の患者が急増していることが、慶應義塾大学の長谷川直樹教授らの調査で13日までにわかった。7年間で2・6倍に増え、推定で10万人当たり14・7人に達した。これまでに報告された各国の罹患（ひか）率の中で最も高いという。患者増は高齢化などの影響が考えられるが詳しい原因はわかっていない。肺非結核性抗酸菌症は水や土などに存在する抗酸菌のうち結核菌とライ菌以外の細菌が引き起こす。人から人へは感染しないとされ、原因になるのは20種類程度という。

慶応大調査

川教授は「発症メカニズムの解明や対策を急ぐ必要がある」としている。肺非結核性抗酸菌症は水や土などに存在する抗酸菌のうち結核菌とライ菌以外の細菌が引き起こす。人から人へは感染しないとされ、原因になるのは20種類程度という。

行する。その経過には宿主・病原菌の両者の関与が推察されるが、その病態は未だに不明な点が多い。NTMは水や土壌等の環境中に常在する弱毒菌だが、疫学的事実として、米国においては他人種に比較してアジア人の罹患率が高いこと（Prevots DR et al. AJRCCM, 2012）や、やせ型の中高年女性に好発すること（Adjemian J et al. AJRCCM, 2012）や、家族集積性のあること（Takahashi M et al. AJRCCM, 2000）から、疾患感受性遺伝子の存在が強く推察されている（下図参照）。



本邦・海外での肺NTM症の疾患感受性遺伝子に関する先行研究として、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析やマイクロサテライトマーカーを用いた解析が行われ、NRAMP1・MICAなどの遺伝子多型の関与が報告されている（Sapkota BR et al. Hum Immunol, 2008）が、先行研究は比較的少数例であり、その再現性や生物学的意義の検証など今後検討すべき課題を含む。

研究代表者は、ヒトからヒトへ感染がない肺NTM症において、居住環境が異なるにも関わらず、同一家系内に肺NTM症の発症が多く見られる報告（Colombo RE et al. Chest, 2010）に着目し、その家系が有している特有の遺伝子の中に、肺NTM症の疾患感受性遺伝子の候補が含まれている事が強く示唆されると考えた。さらに、家族性に発症する肺NTM症患者及び非発症者を含む家系を集積し、次世代シーケンサーを用いた遺伝学的アプローチを行うことで、疾患感受性遺伝子候補を探索できるのではないかとこの着想を得た。

結 果

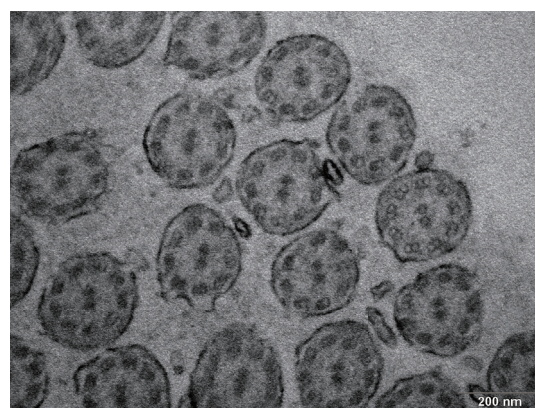
1 SNP解析・エクソーム解析による疾患感受性遺伝子の同定

近年、次世代シーケンサーの登場により、エクソーム解析が臨床研究に広く利用されるようになった。特に、家族性に発症する疾患のエクソーム解析から様々な新規疾患感受性遺伝子が同定されている。研究代表者は、慶應義塾大学医学部倫理委員会から承認を得て（UMIN

ID: 000010891)、家族性肺NTM症患者のDNA検体を、現時点で8家系から合計17名集積した。既に4家系9人のDNA検体のエクソーム解析 (MiSeq, Illumina 社) が終了し、複数の疾患感受性遺伝子が候補として挙げられた。その中でも、下図に示す1家系の内、3人の発症者が存在し、疾患感受性遺伝子の存在が強く考えられる家系に注目し、解析を進めた。具体的には、SNP解析 (Genome-Wide Human SNP Array 6.0, Affymetrix社) により候補遺伝子の存在領域を絞り込み、エクソーム解析によって得られた変異をサンガー法で再度、確認した。その中で、遺伝子Aのフレームシフトが発症者に共通して存在することを見出した。

2 遺伝子Aノックアウトマウスの作成・機能解析

遺伝子Aはマクロファージ及び線毛運動に必須の役割を果たしていると報告されている。肺NTM症においてマクロファージ及び線毛運動が感染防御に関与する可能性が報告されており (Orme IM et al. IAI, 2015)、上述の先行研究から、遺伝子Aが肺NTM症の疾患感受性遺伝子の強力な候補であると考えた。そこで、申請者は、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子Aノックアウト (KO) マウスを作成した。遺伝子AKOマウスの気道上皮の線毛構造には明らかな形態学的異常は認めなかった (右図)。



遺伝子AKOマウスの気道上皮の
電子顕微鏡所見

遺伝子AKOマウスと対照マウスを各々エラスターゼ処理で単離した気道上皮細胞を高速度カメラを装着した顕微鏡により線毛運動を観察し、さらに機能解析を進め、画像解析ソフトにより線毛運動周波数 (ciliary beat frequency: CBF) を測定して、気道線毛遊走能を評価を行っていく予定である。

その他の家系のSNP解析・エクソーム解析からも、線毛関連遺伝子および免疫関連遺伝子の変異を複数認めた (未発表データ)。これらの家族性に発症した日本人肺NTM症のDNA検体を用いた予備研究から免疫機能及び線毛運動という生理機能のホメオスターシスの破綻が肺NTM症の感染・発症に関与していることが示唆された。

考 察

肺NTM症は、クラリスロマイシン、リファンピシン、エタンブトールを中心とする複数の抗菌薬を数年に渡って内服し、中には生涯に渡り抗菌薬を内服しなければいけない患者もいるが、その治療効果は十分でない。申請者らは、肺NTM症は既存の長期間に及ぶ抗菌化学療法に対して抵抗性であり、患者のQOLが低下することを報告してきた (Asakura T, Namkoong H et al, Respir Res. 2016:2)). 特にキードラッグであるクラリスロマイシンに耐性を

獲得すると、難治化し死亡に至る症例が多く ([Namkoong H et al](#), The 107th Annual International Conference of ATS, 2011:3)、リファンピシンの肝機能障害やエタンブトールの視神経障害等、副作用も大きな問題である。現行の抗菌薬治療では効果が限定的であり、新規治療薬の開発には抗菌薬以外の治療を含めた新たな視点が必要である。ドラッグリポジショニングやゲノム創薬の進歩に伴い、申請者が肺NTM症の疾患感受性遺伝子の同定・解析は、画期的創薬の開発につながる可能性がある。

要 約

肺非結核性抗酸菌 (NTM) 症は主に中高年以降の女性に好発する難治性の慢性進行性呼吸器感染症であり、近年、本邦で急激に増加している。NTMは環境常在菌であるにも関わらず、肺NTM症はやせ型の中高年女性に好発すること、人種間で罹患リスクが異なること、家族集積性のあることから、疾患感受性遺伝子の存在が推察されている。家族性に発症する肺NTM症患者及び非発症者を含む家系を集積し、次世代シーケンサーを用いた遺伝学的アプローチを行うことで、疾患感受性遺伝子候補を探索できるのではないかと考えた。特に1家系の内、3人の発症者が存在し、強く疾患感受性遺伝子の存在が想定される家系から、マクロファージ及び線毛運動において重要な役割を果たす遺伝子Aのフレームシフトが発症者に共通して存在することを見出した。CRISPR/Cas9システムにより作成した遺伝子Aノックアウトマウスへ、NTMの代表的な菌である*Mycobacterium avium* complexを感染させ解析すると共に、臨床検体を用いた解析を進めることで、疾患感受性遺伝子の包括的解明に迫った。

文 献

1. [Namkoong H](#), Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, Mitarai S. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016 Jun;22 (6) :1116-7.
2. Asakura T, Funatsu Y, Ishii M, [Namkoong H](#), Yagi K, Suzuki S, Asami T, Kamo T, Fujiwara H, Uwamino Y, Nishimura T, Tasaka S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Health-related quality of life is inversely correlated with C-reactive protein and age in *Mycobacterium avium* complex lung disease: a cross-sectional analysis of 235 patients. *Respir Res.* 2015 Dec 3;16 (1) :145.
3. [Namkoong H](#), Hasegawa N, Kimizuka Y, Tasaka S, Ishii M, Kamata H, Fujiwara H, Funatsu Y, Asano K. The Comparison of Clinical Outcome between Clarithromycin Resistant and Sensitive *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *The 107th Annual International Conference of ATS*, Denver 2011/05