

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	袴田 真理子
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1001 号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Higher genome mutation rates of Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis during human infection. (早期発症者と長期潜伏後発症者より分離した結核菌北京株のゲノム解析)
論文審査委員	主査 教授 小野寺 理 副査 教授 成田 一衛 副査 講師 永橋 昌幸

博士論文の要旨

【背景と目的】

結核は世界の10大死因の一つであり、HIV/AIDSを上回り現在も年間最多の人命を奪っている感染症である。感染成立後、結核には臨床的に二つの状態があり、約5%が半年以内に活動性結核を発症し、残る95%以上は無症候性感染者となる。この未発症者のおよそ10~15%は生涯の間に再燃により結核を発症する。近年、人類の約4分の1が結核に無症候性感染していると推定されているが、潜伏する結核菌北京株の複製率や突然変異率は不明である。潜伏期の突然変異率を理解することは、潜在性結核感染症 (latent tuberculosis infection : LTBI) の治療レジメンの設計に役立つとともに、LTBIが結核の発生母体であることから、結核の制御につながる。

古代より、世界に拡散した結核菌は7系統に分類できる。その中でLineage 4とLineage 2は主にヨーロッパとユーラシア大陸でそれぞれ主要な蔓延系統であり、病原性が高いことが報告されている。特にLineage 2に属する結核菌北京株は、日本を含む東アジア地域の高蔓延系統で、病原性や薬剤耐性化傾向が強いため問題となっている。

病原体ゲノムの変異率は、宿主応答への進化適応と薬剤耐性の出現を反映する。Fordらは、サルに感染した結核菌を全ゲノム解析することで潜伏期の結核菌のゲノム変異率を推定する方法を最初に報告した。この研究ではLineage 4の結核菌が使用され、潜伏期間の長さに関わらずゲノム変異率は同じであるという結論であった。一方人では、Colangeliらが、ニュージーランドで発生した結核集団感染の分離株を用いてLineage 4に属する結核菌は早期発症者の方が長期潜伏後発症者よりもゲノム変異率が高いと報告している。しかし、人に感染した結核菌北京株のゲノム変異率は明らかにされていない。本研究では、早期発症者と長期潜伏後発症者から分離した結核菌北京株のゲノム変異の違いについて解析することを目的とした。

【方法】

1999年に、ある中学校で発生した結核集団感染の接触者と二次感染者の追跡により、2009年までの間に

結核を発症した患者より分離した、起源を同じくする結核菌北京株と、別の事例で初発時と再燃時の患者より分離した結核菌北京株の計 8 株の全ゲノム解析を行った。結核菌のゲノム変異率は、初発から 1 年以内に発症した早期発症者 (rapid-progressor, RP) 由来の結核菌株と 1 年以上の潜伏期を経てから発症または再燃した長期潜伏後発症者 (slow-progressor, SP) 由来の結核菌株の 2 群間で比較した。患者より分離した菌株からゲノム DNA を抽出後、Illumina Genome Analyzer IIx を用いて 75bp paired-end reads を取得し、解析を行った。

【結果】

結核集団感染の患者より分離した 6 株では計 118 の変異が検出された。アミノ酸置換を伴うミスセンス変異の数は、潜伏期間の長さに関わらず同程度であった。イソニアジド予防的単剤治療 (Isoniazid preventive therapy : IPT) を受けた患者由来の株にのみ、katG を含む大きな遺伝子欠失が検出された。katG はイソニアジド (INH) を活性化する酵素をコードする遺伝子であり、INH 耐性の多くが katG 遺伝子の変異により生じると報告されている。この結果から、患者が IPT 治療後に INH 耐性を獲得したことが示唆された。

遺伝子変異が起きた部位は、ゲノム上偏りがなく ($p > 0.2$)、RP と SP 由来株の間でも一定の傾向は認められなかった。また潜伏期の長さに関する特異的な遺伝子変異は検出されなかった。さらに Lineage 4 に属する結核菌を用いた研究と比較しても発症の起こりやすさに関する遺伝子変異は指摘できず、変異はランダムに起こっていることが予想された。

20 時間の世代時間を想定した平均突然変異率は、RP 群が 6.9×10^{-9} mutations/bp/generation である一方、SP 群は 2.8×10^{-10} mutations/bp/generation であり、早期発症者由来の株は長期潜伏後発症者由来の株よりも突然変異率が高いことが明らかとなった。また、本研究で解析した結核菌北京株の突然変異率は、ニュージーランドで起きた結核集団感染の分離株から算出された Lineage 4 に属する結核菌の変異率よりも、およそ 10 倍高い結果であった。遺伝子多型解析では、酸化的損傷に起因すると推定されている変異パターンが、長期潜伏後発症群の方に多く認められた。

【考察と結論】

結核菌北京株の突然変異率は、Lineage 4 に属する結核菌よりも高く、結核菌北京株の高い病原性や薬剤耐性の要因である可能性が示唆された。遺伝子多型解析では、酸化的損傷に起因すると推定されている突然変異が長期潜伏後発症群の方に多く、潜伏期間中にも薬剤耐性変異が起こる可能性が示唆された。

結核菌北京株の高頻度の薬剤耐性化を防ぐためには、感染した結核菌の系統により治療法を検討する必要性も考えられた。今後、結核菌系統の特性を理解し、治療法を工夫することで、結核の薬剤耐性化や重篤化を防ぐ有効な対策の構築につながることを期待される。

審査結果の要旨

結核菌北京株は、日本を含む東アジア地域の高蔓延株であり、病原性や薬剤耐性化傾向が強いため問題となっている。本論文では、早期発症者と長期潜伏後発症者から分離した結核菌北京株の遺伝子変異の違いについて解析した。解析対象は、1999 年に中学校で発生した結核集団感染の接触者と二次感染者のうち 2009 年までに結核を発症した患者より分離した結核菌北京株 6 株と、別の事例で結核再発前後の患者より分離した結核菌北京株 2 株である。

結核菌の突然変異率は、初発から 1 年以内に発症した早期発症者由来と 1 年以上の潜伏期を経てから発症または再燃した長期潜伏後発症者由来の 2 群間で比較した。全ゲノム解析の結果、結核菌北京株の平均突然変異率は早期発症者の方が有意に高く、欧米の高蔓延株である Lineage4 の結核菌よりも高いことが明らかになった。すなわち、結核菌北京株の高い突然変異率が、高い病原性や薬剤耐性の要因である可能性

が示唆された。遺伝子多型解析では、酸化損傷に起因する変異が長期潜伏後発症群に多く、潜伏期にも薬剤耐性変異が起こる可能性が示唆された。結核菌系統の特性を理解し、治療法を工夫することで、薬剤耐性化を防ぐ有効な対策の構築につながる可能性を示した点において、博士論文としての価値を認める。