

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：臨床エビデンス・宿主疾患感受性遺伝子に立脚した気道微小環境への介入による肺非結核性抗酸菌症の新規治療薬創出

Creation of novel therapeutic agents for pulmonary NTM disease by intervention in the airway microenvironment based on clinical evidence and host susceptibility genes.

研究開発実施期間：令和5年4月15日 ～ 令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：南宮 湖

Ho Namkoong

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

学校法人慶應義塾 慶應義塾大学 医学部 教授

Keio University, Keio University School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

【研究開発の目的】

肺非結核性抗酸菌（nontuberculous mycobacteria：NTM）症は、わが国において肺結核を上回る罹患率を示す重要な呼吸器感染症であり、近年その患者数は増加傾向にある。既存治療は長期間の多剤併用療法を要する一方で、治療効果が十分でない症例や再発例も少なくなく、新規治療法の開発が強く求められている。研究代表者はこれまで、大規模臨床コホートおよびゲノム解析を通じて、肺 *Mycobacterium avium* complex（MAC）症の疾患感受性に関与する宿主因子を同定し、その機能低下が肺 NTM 症の発症に関与する可能性を示してきた。

本研究では、これらの臨床エビデンスに基づき、肺 NTM 症における宿主因子 CHP2 および関連分子経路の機能を解析するとともに、独自の膜タンパク質・トランスポーター制御技術を活用し、宿主防御機構を標的とした創薬研究を推進した。特に、病原体そのものを直接標的とする従来型の抗菌薬開発に加え、宿主側の防御機構や気道微小環境を制御することにより、抗酸菌の定着・生存を抑制する新たな治療概念の確立を目指した。さらに、気道上皮細胞、マクロファージ、カイク感染モデルおよびマウスモデルを用いた多層的な評価系を構築し、肺 NTM 症に対する新規宿主指向型治療法の開発基盤を整備することを目的とした。

【研究成果の概要】

まず、CHP2 が宿主細胞における抗酸菌感染制御に果たす役割を明らかにするため、気道上皮細胞およびマクロファージを用いた基礎的機能解析を行った。ヒト気道上皮細胞およびヒト単球由来マクロファージ細胞に対して CHP2 を過剰発現させた細胞系を構築し、*M. avium* 感染実験を実施した。その結果、いずれの細胞種においても *M. avium* 感染が成立することを確認したうえで、CHP2 の過剰発現により細胞内抗酸菌数が有意に減少することを見出した。これらの結果から、CHP2 は気道上皮細胞およびマクロファージの双方において *M. avium* 感染を制限する宿主防御因子であることが示唆された。特に、気道上皮細胞とマクロファージという異なる宿主細胞で同

様の傾向が認められたことは、CHP2 が肺局所における抗酸菌防御に広く関与する可能性を支持するものである。さらに、CHP2 による抗酸菌感染抑制作用が、当初想定していた関連分子 NHE に依存するかを検討した。その結果、NHE の機能を抑制した条件下においても、CHP2 過剰発現による菌量低下効果は維持されていた。また、野生型マウス由来骨髓由来マクロファージを用いた検討においても、NHE 阻害のみでは明確な感染抑制効果は認められなかった。これらの結果から、CHP2 による *M. avium* 感染制御は、NHE に必ずしも依存しない機構を介して発揮される可能性が示された。すなわち、当初想定していた経路に加え、CHP2 を中心とした別の宿主防御経路が存在する可能性が示唆された。

次に、CHP2 欠損マウスを用いて、CHP2 不在下における抗酸菌感染制御機構の解析を行った。野生型マウスおよび CHP2 欠損マウスから骨髓由来マクロファージを調製し、M-CSF 存在下で分化誘導したのち、*M. avium* を用いた *in vitro* 感染実験を実施した。その結果、CHP2 欠損マクロファージでは野生型マクロファージと比較して、細胞内菌量が有意に増加していた。この傾向は独立した複数回の実験において一貫して認められた。以上より、CHP2 はマクロファージ内における *M. avium* の生存・増殖を抑制する役割を担うことが示唆された。過剰発現実験と欠損実験の双方から相補的な結果が得られたことにより、CHP2 の抗酸菌感染制御因子としての意義がより明確となった。

また、CHP2 過剰発現が *M. avium* 感染過程のどの段階に影響を及ぼすかを検討するため、蛍光標識菌を用いたフローサイトメトリー解析を行った。CHP2 過剰発現マクロファージに蛍光標識 *M. avium* を感染させ、菌を取り込んだ細胞の割合を評価したところ、CHP2 過剰発現群では感染細胞の割合が対照群と同程度、またはやや高い傾向を示した。一方、感染細胞をセルソーティングにより回収し、コロニー形成単位 (CFU) アッセイにより生存菌数を定量したところ、CHP2 過剰発現群では対照群と比較して生存菌数が低下していた。これらの結果から、CHP2 は *M. avium* の細胞内取り込み自体を抑制するのではなく、取り込まれた後の細胞内生存を制限することが示唆された。これは、CHP2 が食食や菌の侵入過程ではなく、細胞内環境の制御や抗菌的細胞応答に関与する可能性を示す重要な知見である。

以上の解析から、CHP2 は肺 MAC 症の遺伝学的感受性に関連するのみならず、気道上皮細胞およびマクロファージにおいて抗酸菌の細胞内生存を制御する宿主防御因子であることが明らかとなった。また、その作用機序は、当初想定していた NHE を介する経路に限定されず、NHE 非依存的な新規宿主防御経路を含む可能性が示された。本成果は、肺 NTM 症の病態理解に加え、宿主因子を標的とした新規治療戦略の創出につながる基盤的知見である。

【創薬基盤技術を用いた候補分子探索】

宿主防御機構を制御する新規治療法の開発を目的として、関連膜タンパク質を標的とする候補分子探索系の構築を進めた。本研究では、分担研究者が有する独自のスクリーニング技術を基盤として、標的膜タンパク質の機能を制御し得る生理活性分子群を探索するための系構築を行った。肺 NTM 症に対する宿主指向型治療法の実現には、宿主因子 CHP2 またはその関連経路を制御し得る分子を効率的に同定することが重要であり、本項目ではそのための創薬基盤の整備を進めた。

本技術では、標的膜タンパク質を大腸菌内膜上に発現させる必要があるが、一般にヒト由来膜タンパク質を異種生物である大腸菌内膜に安定発現させることは困難である。そこで、本研究では、標的タンパク質の膜近傍構造に着目し、配列設計、リンカー条件、培養条件および発現誘導条件を総合的に検討した。その結果、標的膜タンパク質の大腸菌内膜における発現量を向上させることに成功し、スクリーニング実施に十分な発現系を構築した。これにより、従来は評価が困難であったヒト由来膜タンパク質を対象とした候補分子探索を進めるための技術的基盤が整備された。

さらに、標的タンパク質に対する多様な結合様式および作用機序を想定し、候補分子ライブラリの設計・最適化を行った。構造生物学的解析および分子進化学的手法を組み合わせることで、相互作用が期待される領域を推定し、その領域を多様化したライブラリを構築した。現在、本ライブラリを用いたスクリーニングを進めており、

今後、標的分子機能を制御し得る候補分子の同定を行う予定である。候補分子が得られた場合には、細胞レベルの感染評価系と組み合わせることで、抗酸菌感染制御能を有する分子の選抜を進める。

一方で、標的膜タンパク質の活性を直接評価するための測定系構築も進めた。当初、大腸菌内膜を用いた活性評価を試みたが、内在性タンパク質に由来するバックグラウンド活性等の影響により、導入したヒト由来標的タンパク質の活性を十分に検出することは困難であった。そのため、現在は、標的タンパク質を高発現可能であり、かつ内在性バックグラウンドの影響を低減できる哺乳類培養細胞系を用いた活性評価系の構築を進めている。今後、評価系の確立後に、候補分子の機能解析、作用機序の検討、および治療応用可能性の検証を行う。

【カイコモデルを用いた創薬ターゲット評価】

抗酸菌の病原性および候補治療介入の有効性を評価するため、既報に基づきカイコ感染モデルを構築した。カイコモデルは、哺乳類モデルと比較して簡便かつ効率的に感染実験を実施できる利点を有しており、候補分子や病原性の初期評価系として有用である。本研究では、*Mycobacterium abscessus* complex (MABC) を対象としたカイコ感染モデルを確立し、複数の臨床分離株を用いて病原性評価を実施した。

その結果、臨床分離株間で病原性に差異が認められ、本モデルが抗酸菌の病原性評価および候補治療法の初期スクリーニングに有用である可能性が示された。今後、本モデルを用いて、宿主因子 CHP2 または関連経路を介した治療介入の有効性評価を進めることで、哺乳類モデルに進む前段階の効率的な評価系として活用する予定である。また、細胞実験やマウスモデルと組み合わせることで、候補治療介入の有効性を多面的に検証することが可能になると考えられる。

【今後の展望】

本研究の進捗により、当初想定していた関連分子 NHE そのものに加え、宿主因子 CHP2 自体が肺非結核性抗酸菌症に対する重要な創薬標的となり得る可能性が示された。これまでの解析から、CHP2 は気道上皮細胞およびマクロファージにおいて *M. avium* の細胞内生存を抑制する宿主防御因子であり、その作用は NHE 活性に必ずしも依存しないことが明らかとなった。この知見は、肺 NTM 症における宿主防御機構の理解を深めるとともに、従来の抗菌薬とは異なる宿主指向型治療法の開発につながるものである。

今後は、CHP2 を中心とした抗酸菌排除機構の分子基盤を、*in vitro* および *in vivo* の両面からさらに詳細に解析する。特に、CHP2 が細胞内抗酸菌の生存環境、宿主細胞内輸送、細胞内小器官機能、および自然免疫応答に及ぼす影響を検討し、肺 NTM 症における宿主防御機構の新規経路を明らかにする。また、CHP2 欠損マウスや各種感染モデルを活用することで、個体レベルにおける CHP2 の役割を明確にし、疾患感受性との関連をさらに検証する。

また、独自の候補分子探索技術および確立中の活性評価系を活用し、CHP2 または関連経路を制御し得る候補分子の同定と機能評価を進める。さらに、気道上皮細胞、マクロファージ、カイコ感染モデルおよびマウス感染モデルを組み合わせることで、候補分子の有効性と安全性を段階的に検証し、肺 NTM 症に対する新規宿主指向型治療法の開発につなげる。これにより、難治性肺 NTM 症に対する治療選択肢の拡充と、臨床応用に向けた創薬基盤の確立を目指す。

Purpose of the Research and Development

Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease is an important respiratory infectious disease whose incidence in Japan has exceeded that of pulmonary tuberculosis, and new therapeutic strategies are urgently needed. Through large-scale clinical cohorts and genomic analyses, the principal investigator has identified host factors associated with susceptibility to pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease and has shown that impaired function of these factors may contribute to the development of pulmonary NTM disease.

Based on this clinical evidence, this study investigated the role of host factor CHP2 and related molecular pathways in pulmonary NTM disease, and promoted drug discovery targeting host defense mechanisms using proprietary technologies for the regulation of membrane proteins and transporters. We also established evaluation systems using airway epithelial cells, macrophages, silkworm infection models, and mouse models, aiming to develop novel therapeutics based on intervention in the airway microenvironment.

Summary of Research Achievements

Functional analyses using human airway epithelial cells and human monocyte-derived macrophage-like cells showed that overexpression of CHP2 significantly reduced the intracellular burden of *M. avium* in both cell types. These findings suggest that CHP2 functions as a host defense factor that restricts *M. avium* infection in airway epithelial cells and macrophages.

We further examined whether the infection-suppressive effect of CHP2 depends on the related molecule NHE, which had initially been assumed to mediate this effect. The reduction in bacterial burden induced by CHP2 overexpression was maintained even when NHE function was suppressed, while inhibition of NHE alone did not produce a clear infection-suppressive effect. These results suggest that CHP2-mediated control of *M. avium* infection may occur through a mechanism not necessarily dependent on NHE.

Using bone marrow-derived macrophages from CHP2-deficient mice, we also analyzed infection control in the absence of CHP2. CHP2-deficient macrophages showed a significantly increased intracellular bacterial burden compared with wild-type macrophages, and this trend was consistently observed in multiple independent experiments. Flow cytometric analysis with fluorescently labeled *M. avium* further indicated that CHP2 overexpression does not clearly inhibit bacterial uptake itself, but rather restricts intracellular bacterial survival after uptake. Taken together, these findings demonstrate that CHP2 is associated with genetic susceptibility to pulmonary MAC disease and regulates intracellular mycobacterial survival in host cells.

Regarding the drug discovery platform, we established a candidate molecule screening system targeting related membrane proteins. By optimizing sequence design, linker conditions, culture conditions, and expression induction conditions, we successfully established an expression system sufficient for screening human-derived membrane proteins. We also designed and constructed a candidate molecule library using structural biological analysis and molecular evolutionary engineering approaches, and screening is currently underway. In parallel, we are developing an activity evaluation system using mammalian cultured cells to reduce the effects of endogenous background activity.

In addition, we established a silkworm infection model targeting the *Mycobacterium abscessus* complex to evaluate mycobacterial pathogenicity and candidate therapeutic interventions. Analysis using multiple clinical isolates revealed differences in pathogenicity among strains, suggesting that this model may be useful for initial screening of candidate therapeutic approaches.

Future Perspectives

This study suggests that host factor CHP2 may represent an important therapeutic target for pulmonary NTM disease. We will further investigate the molecular basis of CHP2-centered mycobacterial elimination mechanisms using both in vitro and in vivo systems, focusing on intracellular bacterial survival, host intracellular trafficking, organelle function, and innate immune responses.

We will also use our proprietary candidate molecule screening technology and activity evaluation systems to identify and evaluate molecules capable of regulating CHP2 or related pathways. By combining airway epithelial cells, macrophages, silkworm models, and mouse infection models, we aim to assess the efficacy and safety of candidate molecules and develop a novel host-directed therapeutic strategy for pulmonary NTM disease.