

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19097

研究課題名(和文)らい菌が有する未知の成分が惹起する宿主細胞の泡沫化と感染メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms that unknown component of *Mycobacterium leprae* induced foamy macrophages

研究代表者

谷川 和也 (TANIGAWA, KAZUNARI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10443110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：らい菌は、マクロファージを宿主として寄生しその中で大量の脂質を蓄積することで泡沫化し生存を維持している。我々は、その過程において特定のトリアシルグリセロール分子種が顕著に蓄積されるとをLC-MS/MSで明らかにした。また、その蓄積には律速酵素であるGPAT3がらい菌に特異的に発現増加していることを明らかにした。さらに、悪性度の異なるハンセン病患者から採取した皮膚スミアサンプルを用いてGPAT3発現を評価すると、らい菌が増殖している検体において高発現していた。これらのことから、らい菌は宿主マクロファージにおいてGPAT3発現を促すことでTAGを蓄積し、自身に有利な環境を構築していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium leprae (M. leprae), the causative agent of leprosy, parasitizes within host macrophages. M. leprae lives and replicates in foamy or enlarged phagosomes within macrophages that are filled with lipids, which provide essential source to form cell wall of the mycobacteria. In the present study, we tried to identify lipid species accumulated following infection and to elucidate the underlying mechanisms for the lipid accumulation in M. leprae-infected macrophages. Most abundant lipid in M. leprae-infected cells was triacylglycerol (TAG). In addition, a large number of fatty acid-containing molecular species were detected in TAG. Expression of GPAT3, a key enzyme in the fatty acid catalysis, was significantly increased in M. leprae infected cells. Further elucidation of specific lipid components in the host cell during infection will establish the mechanism of intracellular survival of M. leprae.

研究分野：脂質生化学

キーワード：らい菌 トリアシルグリセロール GPAT3

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病はらい菌による慢性の感染症であり、皮膚症状や末梢神経障害が主な病状として知られている。また、世界の年間新規患者数は減少傾向あるものの、WHO の報告では未だ約 25 万人が発症している感染症である。多剤併用治療によって寛解が得られるが、再発の可能性や多剤耐性菌の出現、さらに経過中や治療によって死滅した菌体成分に対する急性のアレルギー性免疫反応と考えられる「らい反応」が出現する頻度が高いことなど、治療に難渋する疾患である。らい菌は、結核菌と近縁関係にあるものの、ゲノム中に偽遺伝子や非翻訳領域を占める割合が非常に多く特殊な菌である。それが原因の一つからか、感染力が非常に弱く単独では生きて行けないことから感染モデル動物が確立されておらず、また人工培養ができないことから基礎研究が進んでいないのが現状である。

らい菌は生体内侵入後、ファゴソーム内に大量の脂質を蓄積させたマクロファージを宿主とし生存を維持することが知られている。その機序において我々は、脂質ホメオスタシスの調節を担う adipose differentiation-related protein (ADRP)・perilipin または hormone-sensitive lipase (HSL) の発現調節を介した脂質蓄積を維持するメカニズムが存在することを明らかにしてきた。すなわち、らい菌は宿主遺伝子を利用することで脂質を蓄積するという自身に取って都合の良い環境を構築していると考えられた。しかしながら、ファゴソーム内に蓄えられる脂質成分やその合成系、また細胞外からの取り込みなどの関与については全く研究がなされていない。

2. 研究の目的

ハンセン病の起因菌である「らい菌」は、宿主のマクロファージのファゴソーム内に多量の脂質とともに寄生する典型的な細胞内寄生菌であり、らい菌は宿主由来の脂質を細胞壁合成のための素材として利用していると考えられる。そこで本研究では、らい菌感染により蓄積するマクロファージ内の脂質を同定するとともに蓄積の分子機構を明らかにする。そのために、マクロファージ内の脂肪滴成分を LC-MS/MS 解析を利用して解析し、感染によって変化する脂質分子種の変化を同定する。また、その細胞内合成に寄与する宿主遺伝子について DNA マイクロアレイによって網羅的に解析し、評価する。本研究によって、未だ不明な点が多いらい菌の細胞内寄生機構の主要な部分が明らかにされるとともに、診断や新規治療薬開発の基盤となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究は新たならい菌の細胞内寄生機構を明らかにすることを目的としている。それを達成するために、らい菌感染マクロファ-

ジのファゴソーム内に蓄積される脂質分子種を同定し、その過程で利用される脂質合成に寄与する宿主遺伝子の同定およびらい菌の寄生や増殖に与える影響について明らかにする。蓄積される脂質分子種を同定するために、らい菌を感染させたヒト培養マクロファージ由来の脂質を LC-MS/MS 解析によって網羅的に同定する。その脂質合成に寄与する宿主遺伝子については DNA マイクロアレイをおこない、そのデータをもとに感染による経時的变化、もしくは感染効率をふって特異的に変化する脂質を合成する遺伝子を決定する。悪性度の異なる臨床検体を用いて GPAT3 の発現を比較検討する。

4. 研究成果

(1) らい菌感染マクロファージには大量のトリアシルグリセロールが蓄積する

らい菌をヒト培養マクロファージである THP-1 細胞に添加し、経時的に細胞を回収し Bligh-Dyer によって全脂質を抽出した。そのサンプルをもとに HPTLC 解析を行なった結果、最も顕著に増加したシグナルはトリアシルグリセロールであり、時間依存的に増加していた。一方で、そのほかの脂質成分についてはそのような変化は見られなかったことから、トリアシルグリセロールの絶対量が増加していることが明らかになった。このことから、らい菌は生存を維持するために TAG の蓄積を促している可能性が示唆された。

(2) 宿主へのトリアシルグリセロールの蓄積はらい菌に特異的である

らい菌によって蓄積されるトリアシルグリセロールが、らい菌に特異的か否かを検討を行なった。すなわち、そのコントロールとして加熱して失活させた死菌、貪食のコントロールである latex beads、またらい菌の細胞壁成分である PGN を用いて THP-1 細胞に添加し同様に脂質を抽出した。そして HPTLC にて脂質の分離・同定を試みた。その結果、加熱して失活させた死菌においても、感染後 6 時間で一過性に増加することが示されたが、そのコントロールとして用いた PGN や latex beads ではそのような変化は見られなかった。これらのことから、らい菌は生菌に由来する未知の成分が TAG 合成に寄与していると考えられた。

(3) らい菌はマクロファージに感染することにより、特定のトリアシルグリセロール分子種の合成を促す

シグナルの変動が大きかったトリアシルグリセロールに関して、その構造を同定するために LC-MS 解析を行った。その変化のパターンはそれぞれ異なっており、質量電荷比 (m/z) が 850.71, 904.79 などは 6 時間で増加したのち、24 時間では変化はなく 48 時間で劇的に増加。また、876.8 は短時間で時間依存的に増加し、902.75 は 6 時間から頭打ちに

なるものなども見つかった。一方で、878.76 など変化しないものもあった。さらに、MS/MS 解析によりその炭素数、二重結合からグリセロールにエステル結合している脂肪酸も同定した。この結果から、らい菌は特定のトリアシルグリセロール分子種の合成を促しており、それが生存において重要であると考えられた。

(3) らい菌は宿主マクロファージにおいて GPAT3 の発現を特異的に誘導する

トリアシルグリセロールは細胞内において主に二種類の合成経路が知られており、グルコースから新規に合成するグリセロールリン酸経路、そして TAG の代謝物を再び材料とし再合成するモノアシルグリセロール経路がある。GPAT は新規合成経路であるグリセロール3リン酸から LPA を合成する TAG 合成の律速酵素として知られているため、その影響について検討を行った。すなわち、MOI をふったらい菌を THP-1 細胞に感染させた時の GPAT3 の発現量を real-time PCR および Western blotting により定量的に評価した。その結果、GPAT ファミリーの 4 つのうち GPAT3 のみ、MOI 依存的、時間依存的に増加することが明らかになった。この結果から、らい菌は宿主マクロファージにおいて GPAT3 を選択的に誘導することでトリアシルグリセロールを細胞内に維持していると考えられた。

(4) らい菌特異的に宿主マクロファージにおいて GPAT3 発現を誘導する

(2)の実験と同様に、らい菌のコントロールを用いて GPAT3 の発現変動を評価した結果、らい菌の死菌でも一過性に発現量が増加したが、その他のコントロールでは変動は見られなかった。この結果は、HPTLC で評価した TAG の蓄積の結果と相関していた。らい菌が有する未知の成分が GPAT3 の発現誘導を持続的に維持し、それがトリアシルグリセロールの増加につながっていると考えられた。

(5) L 型ハンセン病患者において GPAT3 が高発現する

ハンセン病は臨床において L 型ハンセン病であるらい腫型と T 型である類結核型に分けられる。L 型においても、さらに BL、LL 型と分類され、LL 型は最も悪性度が高いことが知られている。そこで、病型の異なるハンセン病患者由来のスミア皮膚生検から RNA を抽出し、GPAT3 の発現量を RT-PCR で評価した。その結果、BL 型のハンセン病患者において、8 例中 7 例で、また LL 型で 4 例中 4 例と、特に発現量が高いことが示された。悪性度が増すと、らい菌の増殖も増しているため、結果 GPAT3 を効果的に増加していると示唆された。これらの結果から、らい菌はトリアシルグリセロールの合成・蓄積を促すために宿主マクロファージの GPAT3 発現を利用し、その結果

自身の有利な環境を構築していると考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

谷川和也、Luo Yuqian、鈴木幸一、中村康宏、原田史子、唐澤健。GPAT3 はらい菌感染マクロファージにおいて TAG 合成を促す。日本薬学会第 138 年会。2018 年

谷川和也、鎌田理代、油井聡、中村康宏、原田史子、唐澤健。ヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞の運動能・浸潤能における PAF の関与。第 59 回日本脂質生化学会。2017 年。

谷川和也、Luo Yuqian、鈴木幸一、濱弘太郎、横山和明、中村康宏、原田史子、唐澤健。らい菌は宿主マクロファージの GPAT3 発現を促しトリアシルグリセロールを蓄積する。日本薬学会第 137 年会。2017 年。

Kazunari Tanigawa, Yuqian Luo, Koichi Suzuki, Kotaro Hama, Kazuaki Yokoyama, Yasuhiro Nakamura, Ayako Harada, Ken Karasawa. Determination of triacylglycerol species that accumulates following *Mycobacterium leprae* infection. 48th APACPH. 2016.

谷川和也、Luo Yuqian、鈴木幸一、濱弘太郎、横山和明、中村康宏、原田史子、唐澤健。らい菌感染マクロファージに蓄積するトリアシルグリセロール分子種の同定。第 89 回日本生化学会大会。2016 年。

谷川和也、林康広、中村康宏、原田史子、山下純、野尻久雄、唐澤健。巨核芽球性白血病細胞株 CMK-7 の分化における PAF の関与。第 58 回日本脂質生化学会。2016 年。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷川和也 (Kazunari Tanigawa)
帝京大学薬学部・助教
研究者番号：10443110

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

鈴木幸一 (Koichi Suzuki)
帝京大学医療技術学部臨床検査学科・教授
研究者番号：20206478

(4) 研究協力者