

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17805

研究課題名(和文) 沖縄に残るハンセン病既存検体を用いた遺伝子発現解析による各病型の発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis by the gene expression

研究代表者

林 健太郎 (HAYASHI, KENTARO)

琉球大学・病院・助教

研究者番号：50631991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：琉球大学病院皮膚科でハンセン病と診断した63症例より、トランスクリプトームデータ抽出を試みた。うち7検体(ハンセン病多菌型4検体、少菌型3検体)から抽出できた。Mycobacterium leprae のmapped read countは、多菌型群の4検体は平均2396.5、少菌型の3検体は平均8.7であった。この結果は、病型分類が正しいことを裏付けている。これら多菌型と少菌型について、遺伝子発現の群間比較解析を行った。その結果、2群間に発現に差異のあった遺伝子は約166個($p<0.01$ 、多菌型群に高く発現：117遺伝子、少菌型群に高く発現：49遺伝子)あり、候補遺伝子として抽出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の解析により得られた候補遺伝子により、これまで説明できなかった、宿主により多菌型、少菌型と極めて異なる臨床像を呈するハンセン病の特殊性を解明する糸口になると期待できる。ハンセン病の発症機序の解明は、皮膚結核やブルリ潰瘍などの抗酸菌感染症と、それらに対する生体の反応を理解するきっかけになると考えられる。現在は、ハンセン病の新規発症は日本では年間数例程度であるが、世界では年間20万人の新規発症があり、ほとんどが途上国、貧困層を中心に流行している。顧みられない熱帯病の一つとして位置付けられ、WHOを中心に診断、治療、啓蒙活動が行われている。かつてハンセン病が多発した沖縄で行うべき研究課題である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to extract transcriptome data from patients diagnosed with Hansen's disease at the Department of Dermatology, University of the Ryukyus. We were able to extract data from 7 out of 63 samples (4 with Multibacillary type and 3 with Paucibacillary type). The mean mapped read count for the genome of Mycobacterium leprae was 2396.5 for the four samples of the Multibacillary type group and 8.7 for the three samples of the Paucibacillary type group. This result supported the correctness of the classification of Multibacillary and Paucibacillary types. We compared the gene expression between the two groups. As a result, about 166 genes ($p<0.01$, highly expressed in the Multibacillary type group: 117 genes, highly expressed in the Paucibacillary type group: 49 genes) were found to be differentially expressed between the two groups and were extracted as candidate genes.

研究分野：皮膚感染症

キーワード：ハンセン病 らい菌 多菌型ハンセン病 少菌型ハンセン病 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病はらい菌による抗酸菌感染症であるが、発症した宿主により多菌型、少菌型、境界型と極めて異なる臨床像を呈し、治療過程の副反応であるらい反応の頻度や病態も全く異なる。これは不可逆的な神経障害を残す原因となるが、その差異が何に起因するのかは未だ全く知られていない。

らい菌は、ヒトに感染しても必ずしも発症せず、宿主の免疫能や全身状態、栄養状態、生活環境が、発症や病型に大きく関与する。同一の病原菌でありながら、あたかも全く異なる感染症のように、大きく異なる病状をとりうる疾患は、ハンセン病以外に存在しない。

抗酸菌の1種である *Mycobacterium leprae* (らい菌) による感染性肉芽腫症で、主に皮膚のマクrophageと末梢神経鞘の細胞内に持続感染する。起炎菌であるらい菌は、未だに人工培地での培養も成功しておらず、ハンセン病の病態解明が進まない一つの要因と考えられる。

これまでは細胞の種類や形態、一部のタンパク質の発現しか評価することができず、さらに病原性抗酸菌の中でも、らい菌のみは未だに人工培地での培養が不可能であり、病態解明や治療法の選択が進まない要因となっていた。しかし、現在はパラフィン組織由来のトランスクリプトームデータから遺伝子発現変動について網羅的に解析が可能となった。

2. 研究の目的

ハンセン病のその臨床症状や治療反応性は患者個々で大きく異なる。細胞性免疫がある程度働く場合は、病変部にらい菌がほとんど確認できない少菌型として発症し、貪食しても殺菌できない場合は多菌型となり、全身に結節、紅斑や局面が多発し、病変部には無数のらい菌が存在している。つまりハンセン病は、同じらい菌への感染でも、宿主のらい菌に対する反応性の違いにより、全く異なった症状や病態を呈する、特殊な感染症である。

組織像も多菌型では、泡沫細胞化した組織球形肉芽腫を形成し、液性免疫優位な反応が生じていると考えられている。一方、細胞性免疫がある程度働く少菌型の皮膚組織では、泡沫化した組織球は見られず、結核感染で見られる類上皮肉芽腫が主体の肉芽腫であり、リンパ球浸潤の程度も強い。少菌型はらい菌が侵入した神経線維に対しても細胞性免疫が強く働くために、神経破壊により感覚鈍麻、感覚消失を容易にきたす。さらに、境界型という多菌型と少菌型を移行する病型をとる患者も存在する。らい菌は、ヒトに感染しても必ずしも発症せず、宿主の免疫能や全身状態、栄養状態、生活環境が、発症や病型に大きく関与する。同一の病原菌でありながら、あたかも全く異なる感染症のように、大きく異なる病状をとりうる疾患は、ハンセン病以外に存在しない。

ハンセン病の特徴的なスペクトラムは病理学的な浸潤細胞の動向と、血中サイトカインの解析が報告されるのみであり、実際にRNAレベル、タンパク質レベルでどのような差異や動きがあるのか、病型間で解析した情報はこれまでにない。

ハンセン病は公衆衛生の改善と治療法の確立により、日本人での発症は他府県では激減している。しかし、沖縄県はかつてハンセン病の多発地域であり、琉球大学ではこれまで診断加療してきたハンセン病患者の生検組織が多数保存している。本研究課題では、これまで琉球大学病院皮膚科に蓄積されてきた病理標本について、網羅的にトランスクリプトーム解析を行い、らい菌に対する免疫応答が実際の皮疹部でどのように生じているのか、各病型や「らい反応」ではどのような違いがあるのか、ハンセン病の特殊性を浮き彫りにすることを目的とする。これまで、パラ

フィン組織の利用は、病理学的な評価に限られ、細胞の種類や形態や免疫染色で狙った一部の、非常に限られたタンパク質の発現しか評価する事しかできなかった。しかし、現在は、パラフィン組織から安定して短鎖 RNA を抽出することが可能となり、保管されている多数のパラフィン組織を用いて、その遺伝子発現について網羅的に解析することが技術的に可能となっている。

3. 研究の方法

これまでに、琉球大学病院皮膚科において、ハンセン病と診断した病変部パラフィン組織が残存している検体を用いる。ハンセン病患者を、大きく多菌型、少菌型の2群に分類し、それぞれのパラフィン組織から RNA を抽出し、遺伝子発現について網羅的に解析する。トランスクリプトームの生データの検出までは、株式会社マクロジェン・ジャパンに外注委託する。遺伝子発現変動解析では、数千におよぶ多数の統計学的有意差を持った遺伝子が検出される。複数の統計学的解析を行い、階層状に発現に差異のある遺伝子の候補を絞り込む。ハンセン病の多菌型、少菌型の2群のそれぞれに高発現、または低発現である遺伝子について、遺伝子発現変動解析を行う。1万サンプル以上の正常組織トランスクリプトームデータを持つデータベースの Genotype-Tissue Expression (GTEx) (The GTEx Consortium, Nat Genet. 2013) や、アトピー性皮膚炎や乾癬など、代表的炎症性皮膚疾患の登録済みの公開発現解析データも利用し変動遺伝子群の抽出に用いる。さらに遺伝子発現に統計学的な有意差を持つ遺伝子群についてパスウェイ解析を行い、各病型に関連する生物学的経路を探索する。上記の発現変動解析で得られた病型特異的遺伝子の発現をリアルタイム PCR で再検証し、蛋白発現の局在性を免疫染色で確認する。

4. 研究成果

これまでに琉球大学病院皮膚科でハンセン病と診断し、パラフィン組織が残存している症例の中から、トランスクリプトームデータの抽出を試みた。63検体について RNA の抽出を行い、解析可能なトランスクリプトームデータを取得できたのは、7検体（ハンセン病多菌型4検体、少菌型3検体）であった。

抽出したトランスクリプトームデータについて、*Mycobacterium leprae* の genome 対する mapped read count は、多菌型群の4検体は平均 2396.5 (51-5261) で、少菌型の3検体は平均 8.7 (7-11) であり、実際の病型を反映した read count であることが確認できた。

さらに、これら多菌型と少菌型について、遺伝子発現の群間比較解析を行った。

結果、2群間に発現に差異のあった遺伝子は約 166 個 ($p < 0.01$, 多菌型群に高く発現: 117 遺伝子, 少菌型群に高く発現: 49 遺伝子) あり、候補遺伝子として抽出できた。

さらに、 $p < 0.01$ の 166 遺伝子の中から、偽遺伝子や Y 染色体遺伝子を除き、平均的に差異があるものを抽出し、候補遺伝子を選んだ。

多菌に多く発現している遺伝子が 49 遺伝子、少菌に多く発現している遺伝子は 36 遺伝子と合計 85 遺伝子が抽出できた。現在、これらの候補遺伝子について、pathway 解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakugawa H, Hayashi K, Uema M, Miyagi T, Utsumi D, Yamaguchi S, Takahashi K	4. 巻 47
2. 論文標題 Carney complex 1 with PRKAR1A mutations presented with multiple repeated skin myxomas : a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e122-e124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15254.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Omine T, Miyagi T, Hayashi K, Yamaguchi S, Takahashi K	4. 巻 47
2. 論文標題 Clinical characteristics of hidradenitis suppurativa patients in Okinawa, Japan: Differences between East Asia and Western countries	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dermatol	6. 最初と最後の頁 855-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 FUKAI Kyoko, KOMATSU Kotaro, MATSUO Yuji, HAYASHI Kentaro, KARIYA Yoshiyuki, MIYAGI Takuya, YAMAGUCHI Sayaka, TERUYA Misao, TAKAHASHI Kenzo	4. 巻 81
2. 論文標題 Two Cases of Squamous Cell Carcinoma Arising on Refractory Skin Ulcers in Patients with a History of Hansen's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nishi Nihon Hifuka	6. 最初と最後の頁 115 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2336/nishinihonhifu.81.115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀川知久, 松尾雄司, 山城充士, 林健太郎, 高橋健造
2. 発表標題 琉球大学における2018年の皮膚悪性腫瘍症例のまとめ
3. 学会等名 第89回沖縄地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下地志月, 大嶺卓也, 林健太郎, 山城充士, 高橋健造
2. 発表標題 多発性脂腺嚢腫から発生した有棘細胞癌の1例
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀川知久, 松尾雄司, 山城充士, 林健太郎, 宮城拓也, 高橋健造
2. 発表標題 ダブラフェニブ・トラメチニブ併用療法により横紋筋融解症を来した悪性黒色腫の1例
3. 学会等名 第90回沖縄地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮城拓也, 工藤真未, 小濱望, 新城愛, 下地志月, 伊藤誠, 小松恒太郎, 松尾雄司, 林健太郎, 山口さやか, 山本雄一, 高橋健造
2. 発表標題 琉球大学附属病院皮膚科の2019年度の紹介患者の報告
3. 学会等名 第90回沖縄地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林健太郎
2. 発表標題 化膿性汗腺炎の治療選択
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 さやか, 上原 遥, 兼島 明子, 伊藤 誠, 松尾 雄司, 佐久川 裕行, 山城 充土, 深井 恭子, 岡本 有香, 宮城 拓也, 林 健太郎, 安村 涼, 内海 大介, 新嘉喜 長, 山本 雄一, 高橋健造
2. 発表標題 2018年度琉球大学医学部皮膚科外来紹介患者のまとめ
3. 学会等名 第87回沖縄地方会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼島 明子, 林 健太郎, 上原 遥, 伊藤 誠, 松尾 雄司, 高橋 健造
2. 発表標題 両腸骨部のTumoral carcinosisの一例
3. 学会等名 第86回沖縄地方会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------