

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07012

研究課題名（和文）らい菌による宿主由来TAGを利用した細胞内寄生機構の解明と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidation of intracellular parasitic mechanisms using host-derived TAG by *Mycobacterium leprae* and search for new therapeutic targets

研究代表者

谷川 和也 (TANIGAWA, KAZUNARI)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：10443110

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）：らい菌の生存には、宿主細胞に蓄積される triacylglycerol (TAG) が重要であるが、菌がどのように利用するかについては不明である。本研究では、TAGがらい菌の細胞壁脂質ミコール酸に利用される可能性について研究を行なった。らい菌が感染したTHP-1細胞にはTAGの代謝物である脂肪酸が増加し、次いでミコール酸が検出されたが、ミコール酸合成阻害薬により消失した。BODIPY標識したTAGを含む細胞に感染したらい菌は、菌体に一致してBODIPYの蛍光が観察された。これらの結果から、らい菌は感染細胞内のTAGの代謝活性を有し、その代謝物を利用して菌のミコール酸を合成すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題によって、らい菌の細胞内寄生や生存に必須である宿主細胞内脂質について、その利用経路の1つが明らかになった。今後は、ミコール酸合成の阻害薬であるイソニアジドや宿主由来脂質の蓄積を防ぐような脂質代謝改善薬がハンセン病の新たな治療戦略として応用できると考えられる。現在のハンセン病治療薬は薬価が高いため、既に市場にある薬で応用できれば、貧困な国に多いハンセン病の治療薬として社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Triacylglycerol (TAG) accumulated in host cells is important for the survival of *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), but how the bacterium utilizes it is unknown. In this study, we investigated the possibility that TAG is utilized for the cell wall lipid mycolic acid of *M. leprae*. In THP-1 cells infected with *M. leprae*, fatty acids, which are metabolites of TAG, increased, and mycolic acid was subsequently detected, but this disappeared after treatment with a mycolic acid synthesis inhibitor. In *M. leprae* infected cells containing BODIPY-labeled TAG, BODIPY fluorescence was observed in the bacterium. These results suggest that *M. leprae* has metabolic activity for TAG in infected cells and uses the metabolites to synthesize mycolic acid for the bacilli.

研究分野：細菌学

キーワード：ハンセン病 らい菌 脂質 ミコール酸 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は未だ世界で年間 20 万人以上の新規患者が発症する重要な感染症である。起因菌であるらい菌は、ゲノム中に偽遺伝子や非翻訳領域が占める割合が非常に高く、機能する遺伝子が少ないことから細胞壁の複雑な脂質合成を含め宿主に対する依存性が強いと考えられている。感染後、真皮組織球のファゴゾーム内に大量の脂質を蓄積させることで細胞内での生存を維持すると考えられている。我々は、蓄積される脂質が TAG であることを示し、それには宿主由来の TAG 合成の律速酵素である glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (GPAT3) の発現誘導が重要であり、菌の生存において必要不可欠であることを明らかにした。これらのことから、らい菌は生存を維持するために、宿主遺伝子を利用することで TAG を蓄積維持し都合の良い環境を構築していると考えられるが、らい菌が TAG をどのように利用するかについては不明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、らい菌感染によって宿主細胞内に誘導される TAG が菌にどのように利用されているかを明らかにすることである。それによって、これまで報告してきた脂質蓄積メカニズムの全貌が明らかになり、ハンセン病における新たな治療戦略に応用できる可能性が考えられる。宿主細胞内に蓄積される TAG に着目した報告はこれまでになく、ミコール酸のようならい菌特有の細胞壁脂質中の長鎖脂肪酸に関連づけられるのは、我々のグループが先駆けている研究項目であるからであり、独創性が高い。本申請課題によってらい菌感染細胞に蓄積される TAG の利用経路が明らかになれば、結核などの類似の病態を示す疾患にも応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

らい菌の細胞壁脂質の主成分であるミコール酸は様々な状態で細胞壁に発現し、その構成は菌の状態によってダイナミックに変容して宿主への免疫応答に影響を及ぼすことが知られている。我々は、LC-MS/MS 解析によって、蓄積される TAG を構成する脂肪酸を同定していることや、らい菌が ^{14}C 標識ステアリン酸をミコール酸に取り込む等の予備データを得ていることから、TAG がミコール酸の基質になり得ることが想定される。本研究では、蓄積される TAG をらい菌がどのようにして利用するかを明らかにし、寄与する遺伝子を同定することでらい菌の生存への影響を評価する。

(1) 宿主細胞に新規に合成された TAG に対するらい菌の代謝活性の評価

予備検討によって、ヒト単球由来細胞株 THP-1 にらい菌を感染させると感染細胞に beta 酸化が誘導された。また、 ^{14}C 標識ステアリン酸をらい菌と培養すると、 ^{14}C のシグナルはミコール酸画分に認められた。これらのことから、らい菌は新規に宿主細胞内に産生誘導された TAG を材料に、beta 酸化を介してミコール酸合成に利用している可能性が考えられる。そこで、 ^{14}C 標識 acetic acid を用いて THP-1 細胞に TAG 合成を促した後にらい菌を感染させた後に、Bligh-Dyer 法で抽出した脂質を TLC によって ^{14}C 由来の TAG 代謝産物を評価する。

(2) TAG 代謝産物のらい菌のミコール酸脂質への応用について

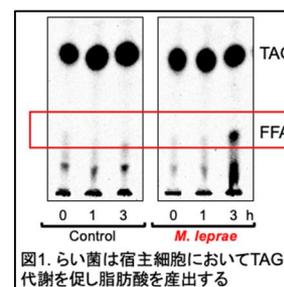
TAG の代謝産物が、らい菌のミコール酸細胞壁脂質に応用される可能性について検討を行う。 ^{14}C 標識 acetic acid を加えて培養した THP-1 細胞にらい菌を感染させ、経時的に細胞かららい菌のみを回収する。Bligh-Dyer 法で抽出した脂質をアルカリ処理し脂肪酸を遊離させる。薄層板クロマトグラフィー (TLC) で分離後、ミコール酸を評価する。得られたシグナルは、ミコール酸合成阻害薬であるイソニアジドを用いて検証する。

(3) 宿主由来脂質がらい菌の細胞壁脂質として応用されるかの検討

BODIPY 標識した脂肪酸を THP-1 細胞に加えて培養し、BODIPY 標識された TAG を形成させる。細胞内の TAG は、共焦点顕微鏡と TLC で評価する。その後、らい菌を感染させ、24 時間後に菌を回収し、共焦点顕微鏡により菌体から BODIPY の蛍光を観察する。

4. 研究成果

(1) はじめに、 ^{14}C 標識 acetic acid は THP-1 細胞に ^{14}C 標識 TAG の合成・蓄積を促すことを確認した。TAG を合成させた細胞にらい菌を感染させると、遊離脂肪酸 (FFA) のシグナルが感染後 3 時間から検出されたが、コントロールでは見られなかった (図 1)。この結果から、らい菌は感染細胞に蓄積される TAG の代謝活性を有すると考えられた。



(2) らい菌 (Thai53 株) が有するミコール酸が alpha 型と keto 型であることは、菌の脂質を用いた TLC 解析によって確認済みである (図 2 左)。らい菌に新規に合成されるミコール酸については、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 acetic acid を THP-1 細胞に前処理し、 $[^{14}\text{C}]$ で標識された TAG を合成させた。その後、らい菌を感染させ、経時的に菌を回収し、ミコール酸を抽出した。TLC で脂質を分離し $[^{14}\text{C}]$ のシグナルを可視化すると、alpha と keto 型のミコール酸が感染に応じて検出された (図 2 中央)。そのシグナルは、ミコール酸合成阻害薬であるイソニアジド (INH) の添加によって消失した (図 2 右)。すなわち、らい菌は宿主由来の TAG を利用してミコール酸を合成することが可能であると考えられた。

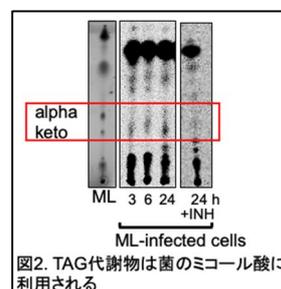


図2. TAG代謝物は菌のミコール酸に利用される

(3) BODIPY 標識脂肪酸を THP-1 細胞に添加して 24 時間培養することにより、BODIPY 由来の脂肪滴が形成されるのを共焦点顕微鏡で観察し (図 3、左) TLC 解析によって、BODIPY を検出すると TAG 画分のシグナルが増加することを確認した。その後、らい菌を感染させ 24 時間後、菌を単離し共焦点顕微鏡で観察すると、BODIPY の蛍光は菌体に一致して観察された (図 4)。これらの結果から、らい菌は宿主細胞由来の脂質を利用して細胞壁脂質に応用していると考えられた。

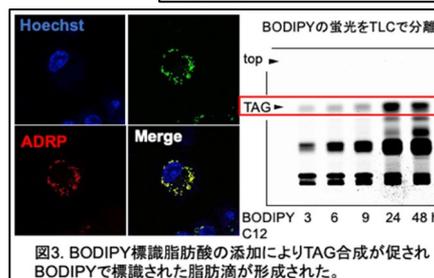


図3. BODIPY標識脂肪酸の添加によりTAG合成が促されBODIPYで標識された脂肪滴が形成された。

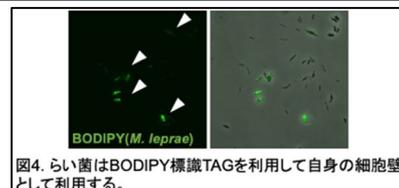


図4. らい菌はBODIPY標識TAGを利用して自身の細胞壁として利用する。

これらの結果から、らい菌は宿主細胞で生存を維持するために TAG 蓄積を促し、それを利用してミコール酸に合成していると考えられた。ミコール酸は宿主からの免疫応答の逸脱に寄与することから、ミコール酸合成の材料を作らせるために感染細胞内に油滴形成を促すと推察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sugawara-Mikami Mariko, Tanigawa Kazunari, Kawashima Akira, Kiriya Mitsuo, Nakamura Yasuhiro, Fujiwara Yoko, Suzuki Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathogenicity and virulence of <i>Mycobacterium leprae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virulence	6. 最初と最後の頁 1985～2011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21505594.2022.2141987	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 Tanigawa Kazunari, Hayashi Yasuhiro, Kawashima Akira, Kiriya Mitsuo, Nakamura Yasuhiro, Fujiwara Yuko, Luo Yuqian, Sugawara-Mikami Mariko, Karasawa Ken, Suzuki Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 The Role of lipids in the intracellular parasitization of <i>Mycobacterium lepra</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Appli Microbiol Open Access	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Luo Yuqian, Kiriya Mitsuo, Tanigawa Kazunari, Kawashima Akira, Nakamura Yasuhiro, Ishii Norihisa, Suzuki Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Host-Related Laboratory Parameters for Leprosy Reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2021.694376	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 Tanigawa Kazunari, Luo Yuqian, Kawashima Akira, Kiriya Mitsuo, Nakamura Yasuhiro, Karasawa Ken, Suzuki Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Essential Roles of PPARs in Lipid Metabolism during Mycobacterial Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1～11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22147597	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 Tanigawa Kazunari, Hayashi Yasuhiro, Hama Kotaro, Yamashita Atsushi, Yokoyama Kazuaki, Luo Yuqian, Kawashima Akira, Maeda Yumi, Nakamura Yasuhiro, Harada Ayako, Kiriya Mitsuo, Karasawa Ken, Suzuki Koichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Mycobacterium leprae promotes triacylglycerol de novo synthesis through induction of GPAT3 expression in human premonocytic THP-1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0249184	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 Hayashi Yasuhiro, Tsuchiya Kiyoto, Yamamoto Mizuki, Nemoto-Sasaki Yoko, Tanigawa Kazunari, Hama Kotaro, Ueda Yusuke, Tanikawa Takashi, Gohda Jin, Maeda Kenji, Inoue Jun-ichiro, Yamashita Atsushi	4. 巻 95
2. 論文標題 <i>N</i>- (4-Hydroxyphenyl) Retinamide Suppresses SARS-CoV-2 Spike Protein-Mediated Cell-Cell Fusion by a Dihydroceramide 4-Desaturase 1-Independent Mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00807-21	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 Nakamura Yasuhiro, Yoshida Momoko, Tanigawa Kazunari, Harada Ayako, Kihara-Negishi Fumiko, Maruyama Keiji, Karasawa Ken	4. 巻 44
2. 論文標題 Deficiency of Type I Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase Catalytic Subunits Causes an Increase in Body Weight	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 920~925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00936	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 谷川和也、川島晃、桐谷光夫、中村康宏、藤原葉子、菅又龍一、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 ハンセン病治療におけるドラッグ・リポジショニングの可能性の検討
3. 学会等名 第5回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、川島晃、桐谷光夫、中村康宏、藤原葉子、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 らい菌は感染細胞の脂質代謝機構を利用して生存を維持する
3. 学会等名 第6回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、川島晃、桐谷光夫、中村康宏、藤原葉子、藤原永年、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 らい菌は宿主細胞由来トリアシルグリセロールを利用してミコール酸を合成する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Mikita, Keiko Gotanda, Lucky Ronald Runtuwene, Tadashi Kikuchi, Akira Kawashima, Mitsuo Kiriya, Kazunari Tanigawa, Naoki Hasegawa, Koichi Suzuki
2. 発表標題 Establishment and evaluation of a simple detection method for rifampicin-resistant Mycobacterium leprae using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to use in SDR-PEP
3. 学会等名 21st International Leprosy Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、濱弘太郎、桐谷光夫、川島晃、Yuqian Luo、中村康宏、山下純、横山和明、原田史子、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 偏性細胞内寄生細菌であるらい菌は宿主由来脂質を利用して寄生を維持する
3. 学会等名 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林康広、土屋亮人、山本瑞生、佐々木洋子、谷川和也、濱弘太郎、上田裕介、合田仁、前田賢次、井上純一郎、山下純
2. 発表標題 新型コロナウイルスの感染効率は宿主細胞のスフィンゴイド塩基の質に影響する
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐谷光夫、藤原葉子、谷川和也、川島晃、中村康宏、鈴木幸一
2. 発表標題 DNA chromatography法を用いたブルーリ潰瘍の簡易検査技術開発
3. 学会等名 第4回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島晃、桐谷光夫、谷川和也、中村康広、藤原葉子、圓純一郎、鈴木幸一
2. 発表標題 ブルーリ潰瘍におけるマイコラクトンの持つ細胞毒性に関する責任分子の探索
3. 学会等名 第4回帝京大学研究交流シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島晃、桐谷光夫、谷川和也、中村康宏、藤原葉子、圓純一郎、鈴木幸一
2. 発表標題 ゲノムワイドスクリーニングを用いたブルーリ潰瘍におけるマイコラクトン依存性細胞死誘導経路の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、桐谷光夫、川島晃、Yuqian Luo、中村康宏、山下純、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 偏性細胞内寄生細菌であるらい菌は宿主由来脂質を細胞壁脂質に利用する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、藤原永年、川島晃、桐谷光夫、中村康弘、藤原葉子、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 らい菌が宿主細胞内 triacylglycerol を利用してミコール酸を合成する可能性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	鈴木 幸一 (Suzuki Koichi) (20206478)	帝京大学・医療技術学部・教授 (32643)	

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
---------	---------