

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790421

研究課題名(和文)マクロファージによる結核菌の休眠への機構の解明

研究課題名(英文)Macrophages conduct the dormancy of Mycobacterium tuberculosis

## 研究代表者

岡 真優子(Oka, Mayuko)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：40347498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージ(M)内で増殖する結核菌は、Mからグルコースを獲得してエネルギー産生を行うと考えられるが、菌とMの間でどのように糖代謝の調節がなされているかは不明である。これまでに申請者は、hypoxia-inducible factor-1alpha(HIF-1alpha)を欠失したMは野生型に比べ菌の増殖を促進することを明らかにした。そこで、HIF-1alphaが調節する糖代謝とM内での菌の増殖との関係を詳細に解析した。その結果、HIF-1alphaは、乳酸脱水素酵素(LDH-A)の転写活性を促し、細胞内のピルビン酸を乳酸に分解することで菌の増殖を調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For intracellular replication of Mycobacterium tuberculosis, glucose is considered one of dominant carbon sources but it is also important for energy production and maintenance cellular functions of the macrophages. However it is unknown how M. tuberculosis infection impacts on the glucose metabolism of the macrophages and in turn, how it affects on the virulence of this pathogen. Hypoxia-inducible factor-1alpha(HIF-1) is one of master regulators of glucose metabolism. In this study we examined whether that HIF-1 has some effects on intracellular growth of M. tuberculosis.

These results shows that HIF-1 protein down-regulates cellular concentration of pyruvate in the intracellular bacterial pathogen-infected macrophages via enhancing LDH-A level, and thus attenuates intracellular replication of M. tuberculosis. Our data demonstrate that regulation of glucose metabolism is critical basic mechanism in controlling intracellular pathogen.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：マクロファージ 結核 HIF-1alpha 糖代謝 低酸素

### 1. 研究開始当初の背景

結核(症)は、グラム陽性結核菌による慢性の肉芽腫性疾患であり、年間に200万人が死亡する最大の細菌感染症である。結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) はマクロファージなどに寄生する細胞内寄生菌で、生体内で増殖と休眠の二相性形態をとることが知られている。しかし、増殖期から休眠期への移行および再燃の機構についてはほとんど不明であり、その究明が急がれる。

申請者は、これまでに低酸素状態の結核肉芽腫病巣に HIF-1 $\alpha$  の発現を明らかにした。しかし、マクロファージでの HIF-1 $\alpha$  の発現は、低酸素だけではなく結核菌感染に伴うことが判明した。さらに HIF-1 $\alpha$  によって調節されている糖代謝酵素が宿主内での結核菌の増殖抑制に関わっている可能性が示唆された。また、HIF-1 $\alpha$  には宿主内での菌の増殖を抑制する役割があり、それは HIF-1 $\alpha$  により調節される解糖経路の糖代謝物が要因となっている可能性を得た。

### 2. 研究の目的

肺肉芽腫において宿主により調節される結核菌の増殖と休眠、すなわち発症と疾患の潜在化への分子機構を明らかにする。そのため、肺結核肉芽腫の低酸素環境とマクロファージに発現する hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) タンパク質に着目し、宿主内での解糖経路によるエネルギー産生機構と結核菌の増殖を詳細に解析した。

### 3. 研究の方法

野生型 (WT) または HIF-1 $\alpha$  欠損 (KO) マウス骨髄由来マクロファージを用いて、*Mycobacterium tuberculosis* または *M. bovis* BCG を 12 時間感染させ、遺伝子発現解析 (マイクロアレイ法) を行った。また、HIF-1 $\alpha$  を初めとするタンパク質レベルは、Western 法によって定量した。さらに、細胞内の菌量は、ルシフェラーゼを用いた ATP 量の測定によって定量した。マクロファージ内の糖メタボローム解析は TOF-MS により解析し、ピルビン酸濃度は Pyruvate assay kit (Bio vision) を用いて測定した。また、<sup>14</sup>Cピルビン酸を用いて、マクロファージおよび結核菌へのピルビン酸の取り込みを固形シンチレーションカウンターで定量した。

### 4. 研究成果

まず、マクロファージは、結核菌の感染によって HIF-1 $\alpha$  の発現を増大した。結核菌の培養上清から精製したタンパク質 (purified protein derivative; PPD) は HIF-1 $\alpha$  発現を増大させず、死菌により増大した。さらに、感染後に HIF-1 $\alpha$  mRNA が誘導されたことから、菌体内成分による転写活性化を介した HIF-1 $\alpha$  タンパク質の増大の機構が示唆された。

結核菌感染 KO マクロファージに発現する遺伝子発現を WT マクロファージと比較した

結果、HIF-1 $\alpha$  によって誘導される乳酸脱水素酵素 A (LDH-A) およびピルビン酸脱水素酵素リン酸化酵素 (PDK1) の mRNA 発現は低いことが明らかになった。そこで、それらの阻害剤を用いた結果、LDH 阻害剤 (oxamate) は、WT マクロファージ内での菌の増殖を促進した。また感染 6 日目において、KO マクロファージ内のピルビン酸濃度は、WT に比べて有意に高かった。炭素源をグルコースまたはピルビン酸のいずれかのみを含む 7H9 液体培地で培養した結果、ピルビン酸を含む培地で菌の増殖が早かった。さらに、<sup>14</sup>Cピルビン酸を結核菌感染マクロファージの培地中に添加したところ、24 時間後に結核菌内に取り込まれていることが確認された。以上の結果より、結核菌感染によってマクロファージに発現する HIF-1 $\alpha$  は、LDH-A を誘導して細胞内のピルビン酸を乳酸に代謝することで菌の増殖を制御している可能性が示唆された。

本研究は、結核菌感染に伴って増大するマクロファージの HIF-1 $\alpha$  の発現機構およびその役割を明らかにすることができた。また、結核菌は、グルコース代謝物のピルビン酸をマクロファージ内で炭素源として好んで利用している可能性が示唆された。これまで、炭素源にはグルコースまたは脂肪酸が利用されていると考えられており、本研究成果は、新しい治療薬の開発につながるのではと考えられる。

### 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 7件)

1. **Osada-Oka M**, Kita H, Yagi S, Sato T, Izumi Y, Iwao H. Angiotensin AT1 receptor blockers suppress oxidized low-density lipoprotein-derived formation of foam cells. *Eur J Pharmacol*. 2012 Mar 15;679(1-3):9-15.

2. Samukawa K, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, **Osada-Oka M**, Miura K, Iwao H. Red ginseng inhibits scratching behavior associated with atopic dermatitis in experimental animal models. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(3):391-400.

3. Yamazaki T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamashita N, Fujiki H, **Osada-Oka M**, Shiota M, Hanatani A, Shimada K, Iwao H, Yoshiyama M. Tolvaptan improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in rats. *Circ Heart Fail*. 2012 Nov;5(6):794-802.

4. **Osada-Oka M**, Ozeki Y, Matsumoto S,

Iwao H. Biomarker for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J The Osaka City Med Associat.* 2012 Des; 61 (3. 4) 81-87.

5. **Osada-Oka M**, Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Niki M, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Ohara N, Yamamoto T, Kobayashi K, Matsumoto S. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol.* 2013 Jan;57(1):30-7.

6. Yamazaki T, Nakamura Y, Shiota M, **Osada-Oka M**, Fujiki H, Hanatani A, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H, Izumi Y. Tolvaptan attenuates left ventricular fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *J Pharmacol Sci.* 2013 Sep 20;123(1):58-66.

7. Yamashita Y, Hoshino Y, **Oka M**, Matsumoto S, Ariga H, Nagai H, Makino M, Ariyoshi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Multicolor Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Related Latent Antigens. *Jpn J Infect Dis.* 2013 66:207-215.

〔学会発表〕(計 9件)

1. Antigen 85A and Mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis.

**Osada-Oka M**, Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Kobayashi K, Matsumoto S.

第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日 ~ 20 日, 千葉市

2. Rapid screening and identification of anti-mycobacterial compounds utilizing recombinant BCG.

Ozeki Y, Nishiuchi Y, Ogura Y, Iwamoto T, Hayashi T, Oka M, Niki M, Tateishi Y, Hirayama Y, Matsumoto S.

第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日 ~ 20 日, 千葉市

3. Glucose metabolism in macrophage suppresses intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis*.

**Oka M**, Matsumoto S, Kobayashi K, Nishiyama M, Shiota M, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Minamiyama Y.

第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 福岡市

4. 結核菌感染に対するマクロファージの生体防御機構.

**岡 真優子**, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 市川 寛, 南山 幸子.

第 66 回日本酸化ストレス学会, 2013 年 6 月 13 日 ~ 14 日, 名古屋市

5. 宿主細胞内で増殖する結核菌のエネルギー産生と増殖機構.

**岡 真優子**, 松本 壮吉, 尾関 百合子, 南山 幸子.

第 7 回細菌学若手コロッセウム, 2013 年 8 月 7 日 ~ 9 日, 広島県三原市

6 Ferritin superfamily protein-like activity in mycobacterial DNA-binding protein 1.

**Osada-Oka M**, Matsumoto S, Ozeki Y, Minamiyama Y.

6<sup>th</sup> Joint Meeting of The Societies for Free Radical Research Australasia and Japan, September 12-14, 2013, in Sydney, Australia

7. 潜在性結核のバイオマーカーとしての抗 Antigen85 および Mycobacterial DNA-binding protein1 抗体.

**岡 真優子**, 立石善隆, 平山幸雄, 尾関百合子, 前倉亮治, 小林和夫, 松本壮吉

第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月 4 日 ~ 5 日, 長崎市

8. Glycolytic enzymes and glucose concentration in macrophages regulate the replication of Mycobacteria. Imagawa Y, **Osada-Oka M**, Ozeki Y, Matsumoto S.

第 87 回日本細菌学会総会，2014 年 3 月 26 日～28 日，江戸川区船堀

9. Relationship between Mycobacterium tuberculosis and protozoa infections among children in Kenya.

Ozeki Y, Takeda C, Okabe M, Inoue M, **Oka M**, Hirayama Y, Ichinose Y, Kobayashi K, Matsumoto S.

第 87 回日本細菌学会総会，2014 年 3 月 26 日～28 日，江戸川区船堀

〔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：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

京都府立大学・生命環境科学研究科

(准教授)

岡 真優子

研究者番号：40347498