

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461527

研究課題名(和文) 抗酸菌感染症における宿主の殺菌機構の分子生物学的解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of anti-microbial activity of the host in mycobacterial infection

研究代表者

福富 康夫 (Fukutomi, Yasuo)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・室長

研究者番号：30189956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗酸菌感染症における宿主の殺菌機構にNADPH oxidase (Nox)を介したシステムが大きく関与していることが示唆された。培養マクロファージ内に存在する細胞内寄生菌としてのらい菌や非結核性抗酸菌は、マクロファージの活性化とともに代謝活性が減少し生菌率が減少すること、そして、それらの菌の周囲にはNoxタンパク複合体が集積していることが種々の蛍光色素の組み合わせと蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による観察で細胞レベルにおいて明らかとなった。殺菌機構には種々の系が考えられているが、Noxにより産生される酸素ラジカルの殺菌への関わりが実際に示された。

研究成果の概要(英文)：Radicals produced by macrophages are believed to play a very important role in intracellular anti-microbial activity in mycobacterial infection. Two pathways of the radical production are widely known, one is depending on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the other depending on NADPH oxidase. For the possibility of involvement of the pathways in mycobacterial infection, we analysed Hansen's disease, since the disease is caused by an infection with *Mycobacterium leprae*. We observed that metabolic activity of *M. leprae* in macrophages incubated in the presence of IFN-gamma (IFN γ) was significantly lower than the activity of the bacilli in macrophages incubated in the absence of IFN γ . Moreover, translocation of phox (phagocyte oxidase) proteins into *M. leprae*-containing phagosomes was significant in IFN γ -stimulated macrophages by confocal laser scanning microscopic observation, indicating that in human anti-*M. leprae* activity could be affected by NOX-dependent pathways.

研究分野：感染症

キーワード：抗酸菌 感染症 マクロファージ 殺菌 NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌、特に結核菌は全世界の三分の一の人口が感染しており、本邦においても年間二十万人以上の新規感染者が発生している。また非結核性抗酸菌症とくに *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は本邦で感染者数が急増しており罹患率は人口 10 万に対し 20 を超えるといわれている。MAC は多くの薬剤に対して感受性が低いことから新しいメカニズムの抗菌薬の開発が望まれている。その抗酸菌の病原性と宿主殺菌因子の関連を明らかにすることは、新規抗酸菌薬の開発に繋がるものと考えられる。

抗菌薬開発には宿主殺菌因子の詳細な解明が必要であるが、活性酸素(ROS)は微生物を殺菌する免疫機構の一つとして知られている。ROS を供給するメカニズムの一つに NADPH オキシダーゼ (Nox) 酵素による機序がある。このうち Nox2 による殺菌機構は比較的解明が進んでいる。Nox2 は、定常(休止)状態では不活性化型であるが細菌貪食やサイトカイン刺激により活性化され、NADPH を用いて酸素から活性酸素への化学反応を触媒する。その結果生成された活性酸素が強力な殺菌剤として作用することになる。Nox の遺伝的欠損症である慢性肉芽腫症 (CGD) は重篤な細菌感染症が頻発する若年性致死疾患であり、宿主の殺菌機構におけるこの酵素の重要性が示唆されている。Nox2 の活性化には、ファゴソーム膜由来の gp91phox と p22phox に、4 種類の細胞質由来の p40phox, p47phox, p22phox, Rac2 が会合することで生じることが知られている (図 1)。多くの細菌はこの Nox2 による活性化を逃れるために、様々な菌由来因子を用いてこのシステム制御していることが知られている。

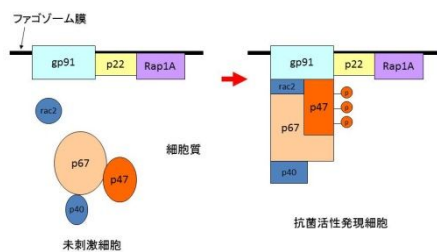


図1. Activation of leukocyte NADPH oxidase

宿主の細菌に対する殺菌機構を細胞レベルで理解しようとする試みは長い間成功してこなかった。その理由としては生細胞と生菌の鑑別あるいは死細胞と死菌の鑑別が困難であることが挙げられる。我々は共焦点レーザー顕微鏡や蛍光顕微鏡を使用し、宿主内に貪食された細菌の呼吸活性を測定することで、菌体成分と呼吸活性のある菌 (= 生菌) を異なる蛍光色素で染色し、死菌と生菌の両者を判別する方法を開発した。この方法を使用すればマクロファージ内の抗酸菌の生

をモニターすることができて簡便な新規抗酸菌薬スクリーニングに応用できることも期待される。

2. 研究の目的

本研究では抗酸菌感染症における宿主の殺菌機構の分子生物学的解明を、各種抗酸菌分離株を使用して主として NADPH oxidase (Nox) を介したシステムを中心として行うことを目的とした。本研究の目的は宿主マクロファージ内に寄生する抗酸菌に対する殺菌現象を細胞レベルで可視化することにある。

3. 研究の方法

ヒトマクロファージの培養：健康人末梢血よりフィコールを用いた比重勾配遠心法により単核球を分離して血清不含 RPMI1640 培地に浮遊させプラスチック製のフラスコにまき 37 度で 1 時間培養した。ハンクス液にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて単球を精製し M-CSF を加えた 20%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 25mMHEPES 含有 RPMI 1640 培地にて 1 週間培養し単球からマクロファージに分化させた。トリプシン処理してマクロファージを回収して、ガラスのカバースリップを入れた 24 穴プレートもしくは 8 ウェルガラスチェンバースライドにまいて培養を継続した。また、ICR マウス腹腔洗浄液からガラス付着性細胞を得て、マウスマクロファージとして用いた。

マクロファージへのらい菌や非結核性抗酸菌などの感染：ヌードマウスフットパッドに接種して増殖したらい菌を回収して精製し、マクロファージが張り付いたウェルに添加して貪食させた。培養後、マクロファージを可溶化して菌を得て菌液を作成しラジオレスピロメトリーにて菌の代謝活性を測定した。なお、マウスの使用については国立感染症研究所動物実験委員会からの承認を得ており、倫理面への配慮がなされている。また、*M. avium* complex (MAC) も用いた。

ラジオレスピロメトリー：Buddemeyer や Franzblau らの方法を改変してらい菌の脂肪酸β酸化反応 (基質：1-¹⁴C-パルミチン酸 (NEC075H)) を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡による観察：蛍光色素 (oregon green もしくは auramine O) にて標識したらい菌や非結核性抗酸菌をマクロファージに添加、一定時間 (4~6 時間) 培養後、HBSS 液にて貪食されなかった菌を洗浄し培養を継続した。培養終了時、菌を含んだマクロファージが張りついている 8 ウェルチェンバースライド、もしくはカバースリップをメタノールで迅速処理してマクロファージを固定後、さらに抗 phox 抗体とインキュベートし、洗浄後 Alexa633 標識二次抗体を反応させ多重染色を行った。同時に Hoechst33342 による核酸染色も行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞を観察した。得られた画像中の各細胞について各チャンネルイメ

ージの overlay を行い各グループにおける細胞の蛍光強度平均値を得た。Photoshop によるイメージ解析も行い蛍光強度の細胞内分布の定量を試みた。また、固定された細胞を cyano-tetrazolium chloride (CTC) と共にインキュベートし、細胞内に存在する菌について、呼吸代謝により蛍光発色した CTC (CTF と呼ばれる) を保有している菌を生菌として評価する生菌鑑別法も併用した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

以前、我々は、マウス腹腔マクロファージが IFN γ により活性化すると抗らい菌活性が高まり、培養マクロファージ内のらい菌の代謝活性が減少することを見出している。らい菌は培養できないため、放射性同位元素標識基質 (パルミチン酸) を代謝したその産物 (標識された二酸化炭素) の産生量を調べ、その産生が低下する反応をマクロファージの活性化に伴った抗菌活性が高まった反応として考察した。CTC 試薬は生菌の呼吸反応により CTC という蛍光色素に変化する。CTC を使用して IFN γ 存在下で培養したマクロファージ内らい菌の生存状態をみたところ、対照培養と比べ、明らかに蛍光量が低下していた (図 2)。

また、ヒトマクロファージでも同様な現象が観察された。さらに、らい菌感染マクロファージを強力な抗らい菌薬であるリファンピシン (RFM)、10 μ g/ml、クラリスロマイシン (CAM)、10 μ g/ml で培養しても CTC 発色率が低下しており、抗菌活性を調べるための有用な方法であることを再確認できた (図 3)。

さらに、ヒトマクロファージに *M. avium* complex を貪食させ IFN γ 存在下で 7 日間培養した後に CTC を加えてみた。IFN γ 非存在下では蛍光を発している菌がみられるのに対し、IFN γ 刺激した細胞内には発色した菌が少なかった。

これまで我々は IFN γ で活性化したマウスマクロファージでは iNOS (誘導型酸化窒素合成酵素) の発現が高まって、産物である NO $_2^-$ や NO $_3^-$ が細胞培養液中に蓄積すること、また、iNOS の阻害物質である MMA (モノメチルアルギニン) は抗菌活性を抑制することを観察してきた。しかし、ヒトマクロファージでは IFN γ による iNOS 発現増強はみられず、MMA による抗菌作用に対する抑制作用もみられなかった。一方、ヒトマクロファージでは IFN γ 刺激により NADPH オキシダーゼ活性化による酸素ラジカル産生増強が起こって同ラジカルにより細菌が殺菌されると報告されている。そこで、NADPH オキシダーゼ構成タンパクである各種 phox の局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。その結果、IFN γ 刺激したマクロファージでは p22phox や p47phox の発現が増強し、p22phox は特に細胞周辺に多く、また、p47phox は細胞質に多く蓄積していることが分かった (図 4、図 5)。p40phox は発

現量は IFN γ 有無で変化はみられなかった。しかし、すべての種類の phox タンパクは IFN γ 刺激マクロファージでらい菌ファゴゾームに集積する傾向にあることが判明した (図 5)。



図2. *M. leprae* in mouse macrophages cultured for 6 days. Conversion of CTC to CTCF (red) by viable bacilli incubation for 4 hr. 41 % cells showed positive with red in the control culture and 11 % cells positive with red in IFN γ -added culture.

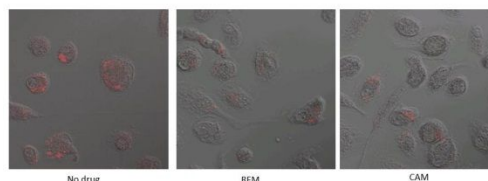


図3. Effect of anti-bacterial drugs on viability of *M. leprae* in human macrophages cultured in vitro. Evaluation of viability of was assessed by conversion of CTC to CTCF (red fluorescence) by metabolically active bacteria.

(2) 考察

らい菌は培養できないためアルマジロ、若しくはヌードマウスに接種して in vivo で増殖させて得るが、我々はヌードマウスフットパッドで増殖した viability の高いらい菌を実験に供与している。以前から IFN γ 刺激したヒトマクロファージの抗らい菌活性発現 (らい菌の代謝低下) を認めている。殺菌にかかわる分子として活性酸素 (ROS) や酸化窒素 (NO) が知られている。ROS は従来細胞毒として宿主に悪影響を与えると考えられていたが、近年微生物を殺菌する免疫機構の一つとして認識されている。ROS を供給する主要な機構の一つに NADPH オキシダーゼ (Nox) 酵素による機構がある。このうち Nox2 による殺菌機構は比較的解明が進んでいる。Nox2 は、定常 (休止) 状態では不活性型であるが細菌貪食やサイトカイン刺激により活性化され、NADPH を用いて酸素への電子付加を触媒して活性酸素を生み出す。その結果生成された活性酸素が強力な殺菌分子として作用することになる。Nox2 による活性化には、ファゴゾーム膜上の gp91phox と p22phox に、細胞質由来の p40phox、p47phox、Rac2 等の会合が必要である。われわれの研究結果ではヒト M-マクロファージの IFN γ 刺激でこれら phox タンパクが細胞内で著明に増加し、さらにらい菌周囲に集積することが判明した。このことは phox タンパクのサブユニットが複

合体を形成し活性型になっている可能性を強く示唆している。そして、TT型ハンセン病にみられるような IFN γ が強く発現している病巣では殺菌作用が増強されていることを示唆している。CTC は呼吸している生菌により還元反応を受けると蛍光を発するので、細胞内に存在する菌の生死判別に用いることができる。今回の一連の研究では、IFN γ で刺激したヒトやマウスのマクロファージ中のらい菌や非結核性抗酸菌である MAC の代謝活性が失われていることから、抗菌活性が誘導されていることが判明した。今後、phox の細胞内局在と菌の CTC 還元反応による蛍光分子生成を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に調べること、Nox の殺菌作用への関わりがより詳細に解明できると思われる。と同時に、細胞内の抗酸菌の生死を鑑別できれば、培養細胞系における抗菌薬のスクリーニングなどより vivo に近い状況を反映した研究を進めることができることから、顕微鏡を利用したイメージング解析手法の開発は非常に有意義であると考えられる。

(3) 引用文献

Shepard CC: Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice. *J Bacteriol* 90:1271-1275, 1965.

Franzblau SG: Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J Clin Microbiol* 2618-2624, 1988.

Adams LB, Franzblau S, Taintor R, Hibbs J Jr, Krahenbuhl JL: L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol* 147: 1642- 1646, 1991.

Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, and Krahenbuhl J.: Subversion of macrophage anti-microbial function bolsters intracellular survival of *M. leprae*. *Int. J. Lepr.* 72: 16-26, 2004.

Makino M, Maeda Y, Fukutomi Y, and Mukai T.: Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection. Microbes and infection* 9:70-77, 2007.

Nakamura M: Elimination of contaminants in a homogenate of nude-mouse footpad experimentally infected with *Mycobacterium leprae*. *Jpn J Lepr* 64:47-50, 1994.

Hatta M, Makino M, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Sabir M, Tandirogang N, Rusyati LM, Kai M, Fukutomi Y, Miyamoto Y, Mukai T, Maeda Y. Detection of serum antibodies to *M. leprae* major membrane protein-III in leprosy patients from Indonesia. *Lepr Rev.* 2009 Dec;80(4):402-9.

Fukutomi Y, Maeda Y, Matsuoka M, Makino M. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi.* 2009 Feb;78(1):7-16.

図4. Expression of p40-phox and p47-phox in IFN γ -stimulated human M-macrophages infected with *M.leprae*.

in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One.* 2009 Aug 12;4(8):e6600.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3件)

福富康夫他：蛍光色素を利用した抗らい菌活性の新しい評価方法（薬剤の抗らい菌活性や宿主細胞の抗らい菌活性評価への応用）第 87 回日本ハンセン病学会、所沢、2014 年 9 月 .

福富康夫：マクロファージの抗らい菌活性発現機構のヒトマウス間の比較（ヒトハンセン病において IFN g はマクロファージの抗らい菌活性を誘導するサイトカインとして機能しているのか）第 88 回日本ハンセン病学会、香川、2015 年 .

福富康夫他：代謝活性を指標とした培養細胞内らい菌生存率評価、第 89 回日本ハンセン病学会、草津、2016 年 6 月 .

6. 研究組織

(1) 研究代表者 福富康夫 (FUKUTOMI, Yasuo) 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・感染制御部・室長
研究者番号：30189956

(2) 研究分担者 星野仁彦 (HOSHINO, Yoshihiko) 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・感染制御部・室長
研究者番号：20569694

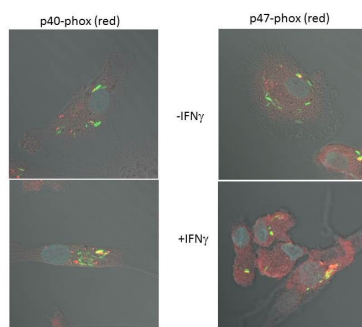


図4. Expression of p40-phox and p47-phox in IFN γ -stimulated human M-macrophages infected with *M.leprae*.

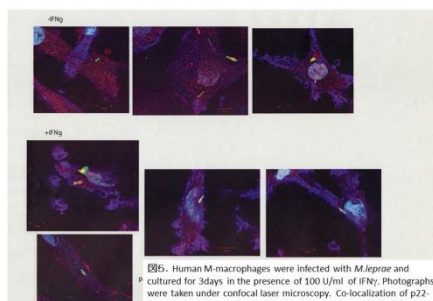


図5. Human M-macrophages were infected with *M.leprae* and cultured for 3days in the presence of 100 U/ml of IFN γ . Photographs were taken under confocal laser microscopy. Co-localization of p22-phox (Alexa568, blue) and p47-phox (Alexa 633, red) with *M.leprae* (green) were obvious in IFN γ -stimulated macrophages (panels of +IFN γ group).

