

令和元年6月10日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01826

研究課題名(和文) 結核菌感染による脂肪組織の機能変動を介したメタボリックシンドローム病態変化

研究課題名(英文) Effects of infection with the Mycobacterium tuberculosis on the development of metabolic syndrome

研究代表者

稲福 征志 (INAFUKU, Masashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：90457458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：先進国においては「肥満」と「結核」が経済的弱者層に集積することが懸念されることから、本研究では結核菌感染がメタボリックシンドローム病態に与える影響についての基礎的知見を得るべくして、結核感染プロトタイプである抗結核ワクチン株BCG菌体を用いた研究を遂行した。BCG菌体投与による脂肪肝の改善作用はBCG菌投与による獲得免疫の活性化が大きくかかわっていることが示唆された。また、BCG死菌体投与による脂肪肝改善は認められなかったものの、BCG菌体成分が褐色脂肪細胞に対して何かしらの影響を与えていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、結核菌感染プロトタイプとしてBCG菌を用いて、それらの投与による肥満病態の変動について検証して、BCG菌による肥満病態の改善作用を示した。それらの肥満病態の変動は生体内における抗BCG菌免疫能の活性化、特に獲得免疫系が肥満病態の改善に関与している可能性が示され、抗結核ワクチンとしてBCG菌を利用している日本においては、この予防接種が肥満健康問題に影響を与えている可能性を示し、今後の新たな研究課題を見出したといえる。

研究成果の概要(英文)： Tuberculosis was strongly associated with neighborhood poverty in the developed countries. To analyze influence of systemic inflammatory response to metabolic syndrome, we inoculated an attenuated vaccine strain of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Gurin (BCG) into obese mice. BCG administration significantly inhibited the development of steatosis in mice, and its events was suggested to be related to the activation of acquired immunity induced by BCG. In addition, although administration of killed BCG did not affect on steatosis, it became clear that the components of BCG affect on the function of brown adipocytes.

研究分野：健康科学

キーワード：肥満 脂肪肝 メタボリックシンドローム 結核 BCG

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肥満と貧困

先進国・途上国では肥満が急増しており、糖尿病、高血圧、高脂血症、心血管疾患、いわゆるメタボリックシンドロームの医療費の増大は大きな社会的な問題となっている。かつて肥満は贅沢病とされてきたが、近年の先進国では貧困層に多く認められることが報告されている (Levine, 2011)。その要因として、貧困層が購入できる安価な食品は炭水化物と脂肪が多い高カロリー・低栄養な物が多いことが上げられている。日本においては、2009年の貧困率は16%であり、貧富格差が広がりつつあるとされる。また、他の先進諸国と同様に貧困層の肥満罹患率は増加しており、健康管理が困難とされる貧困層の健康問題の重度化を加速させる可能性がある。さらには、親から子への『貧困の連鎖』と『児童貧困率』も拡大しており、貧困層への肥満集積が加速的に進行することが懸念される。

### (2) 肥満と感染症

メタボリックシンドロームの発症には各組織の慢性炎症が重要であることが報告されており、肝臓や脂肪組織における種々の免疫細胞が病態形成に大きく関与するとされる (Deng *et al.*, 2009; Lumeng *et al.*, 2007)。一方、肥満は個体の免疫動態を変動させて易感染性を誘発することが明らかとなっている。肥満による易感染性は歯周病原菌感染にも及んでおり (Amar *et al.*, 2007)、歯周病原菌の感染はインスリン抵抗性 (Nishimura *et al.*, 2003) や動脈硬化症 (Geismar *et al.*, 2006; Fong, 1999) を増悪化させることも報告されている。従って、肥満によって誘導される易感染性は、結果的にメタボリックシンドローム病態自体にも大きな影響を与えると考えることができる。これは、アデノウイルス感染が幹細胞の脂肪細胞への分化促進を介して肥満を亢進させるという報告 (Vangipuram *et al.*, 2004) やクラミジア細菌感染が動脈硬化症を増悪化させる (Geismar *et al.*, 2006; Fong, 1999) という報告からも想像に難くない。

### (3) 再興感染症としての結核

感染症は今なお人類にとって最も深刻な病であり、HIV/エイズ(ウイルス感染症)、結核(細菌感染症)、マラリア(寄生原虫感染症)は「世界三大感染症」と呼ばれている。結核は *Mycobacterium* 属に属する真正細菌を原因菌とする慢性の感染症であるが、結核菌は全世界人口の3分の1に潜伏していると評価されている。先進国において結核は主要な健康問題ではなくなったと思われていたが、1980年代後半頃から発生率が逆転上昇に転じて結核の「再興」が露わになっており、他の感染症と同様に貧困層への集積が懸念されている。世界保健機関(WHO)は、1993年に世界規模で「結核非常事態宣言」による警鐘を鳴らしている。結核罹患率が他先進諸国の数倍(米国の1970年頃の水準と同等)となる日本は「結核中進国」として位置づけられており、東京オリンピックが開催される2020年までに結核罹患率の半減を目指して、官民挙げた低蔓延国化が執り行われている。

### (4) 結核と肥満

これまでに「肥満」と「結核」の双方に着目した研究は幾つか行われている。血中レプチン濃度の低下による結核菌の活性化などが報告されており、他の感染症と同様に肥満は結核リスクを高めると示唆されている (Schwenk *et al.*, 2003; Catharina *et al.*, 2004)。しかし、肥満が肺結核感染のリスクを有意に低くする (Leugn *et al.*, 2007) との報告もあり、「肥満」が「結核」に与える影響は明確ではない。一方、「結核」が「肥満」に与える影響についての検証研究は殆ど皆無であり、疫学研究により「結核菌感染はメタボリックシンドローム病態を増悪化に導く」という仮説が立てられたのみである (Erol, 2008)。結核菌は空気・飛沫経路で主に肺を感染部位とするが、リンパや血流にのって全身の肺外臓器にも感染する(粟粒結核)。肥満体では脂肪組織や肝臓にマクロファージが、脂肪組織周辺リンパ節には樹状細胞が多く集積しており、それらがメタボリックシンドローム病態形成の一端を担っていることが報告されている。細胞レベルでの結核菌の感染先はマクロファージや樹状細胞が主であるため、結核菌が脂肪組織周辺の免疫担当細胞を介して間接的に脂肪細胞の代謝・機能を変化させることが予想される。更に、脂肪細胞は結核菌の新たな潜伏先として注目されており (Neyrolles *et al.*, 2006)、結核菌が直接的に脂肪細胞に影響を与えてメタボリックシンドローム病態を変動させる可能性もある。

## 2. 研究の目的

経済弱者層への集積が懸念される「肥満」と「結核」の相互関係について検証することは今後の健康問題を考える上で重要であるが、科学的に両疾患の相互関係について検証した報告は非常に少なく、特に結核菌感染による肥満病態の変動について検証は行われていない。そのような背景を踏まえて、申請者は、結核ワクチンとして利用される弱毒株 BCG 菌を用いて肥満モデルマウス *ob/ob* マウスのメタボリックシンドローム病態に与える影響について検証しており、BCG 菌感染による血中高分子量アディポネクチンレベルの上昇とインスリン抵抗性の改善を確認している。この結果は、結核菌感染によって脂肪細胞(組織)の代謝・機能が変動することを示唆するものであり、その機序について理解を深めることは、「結核」が「肥満」に及ぼす影響についての基礎的知見を得ることに繋がると考えられる。

以上の背景を踏まえて、当該研究は「肥満」と「結核」の両疾患を結びつけて、結核菌が脂肪組織（細胞）の機能・代謝、ならびにメタボリックシンドローム病態に及ぼす影響についての基礎的知見を得ることを目的として、日本の健康増進に寄与しようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) *M. bovis* BCG 菌株（以下 BCG 菌）投与によるマウス脂質代謝に及ぼす影響

本研究では、結核菌感染モデルのプロトタイプである *Mycobacterium bovis* BCG 菌株（以下 BCG 菌）を *ob/ob* マウスに尾静脈より投与して、10 日、20 日、及び 30 日後におけるマウスの肥満病態に関して解析を行った。また、BCG 菌体投与によるメタボリックシンドローム病態変動に関して、それらが生菌による影響であるのかを確認するために、パラホルムアルデヒドにて不活化した死菌体を作製して、それらを投与したことによる影響についても観察した。

#### (2) *M. bovis* BCG 菌株（以下 BCG 菌）が脂肪細胞および肝細胞に与える影響

BCG 菌が脂肪細胞ならびに肝細胞に与える影響については、培養細胞系による評価を行った。脂肪細胞としてはマウス由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 を脂肪細胞へと分化させたものを用い、肝細胞はヒト由来肝ガン細胞 HepG2 を用いた。それらの細胞を BCG 菌と共培養して、脂質代謝に及ぼす影響ならびに遺伝子発現変動について解析を行った。

### 4. 研究成果

先行研究においては、BCG 菌体投与 30 日後における肝臓への脂質蓄積が有意に低下していることを確認しており、更には BCG 菌体投与群の BCG 感染群のインスリン抵抗性（HOMA-IR）の有意な低下と血中高分子量アディポネクチン濃度の有意な上昇が認められていた。本研究では、その全ての影響は BCG 生菌体投与群においては確認ができたものの、BCG 死菌体投与群においては確認することができなかった（図 1）。また、それら BCG 菌体投与の影響の全ては投与後 10 日目および 20 日目には認められなかったことから、BCG 菌体投与による肥満病態変動は遅発的に生じる現象であることが明らかとなった。次に、BCG 菌体投与した際の肝臓における免疫細胞の変化について解析を行ったところ、肝臓リンパ球の増加が BCG 菌体投与 30 日後においてのみ認められ、その多くは T 細胞の増加によって齎されていた。更には、CD69 陽性 T 細胞の割合も同様に増加していたのに対して、NKT 細胞数と CD69 陽性 NKT 細胞の割合は BCG 菌体投与 30 日後においてのみ減少していた。これらの免疫細胞数の変化は、前述した肥満病態パラメーターの変化と同様に BCG 死菌体投与群には認められなかった。また、先行研究においては HepG2 細胞を BCG 菌と共培養した際には、脂肪酸暴露した際に生じるインスリン抵抗性が緩和されることを見出しており、それらは小胞体ストレスの軽減によって生じている可能性を示していた。本研究においては、脂肪酸暴露をしていない際の BCG 菌体共培養 HepG2 における遺伝子発現の変動について網羅的に解析を行ったところ、大きな変動は認められないことが明らかとなった。従って、BCG 菌体が肝細胞に与える影響は肥満病態が進行した際にのみ認められる可能性があり、更には、肝臓への脂質蓄積の抑制は免疫系の変化が深く関与している可能性が示された。

次に、脂肪組織ならびに脂肪細胞に対する BCG 菌体投与の影響について確認した。BCG 菌体投与したマウスの白色脂肪組織においては、各所組織重量は投与後 30 日目にて低値傾向を示しており、死菌体投与によっては認められなかった。その一方で、褐色脂肪組織重量は投与後 20 日目より低値を示しており、この現象は BCG 死菌体の投与によっても認められた（図 2）。従って、BCG 菌体成分は褐色脂肪組織に何かしらの影響を与えることが示され、この現象がミコール酸以外の菌体成

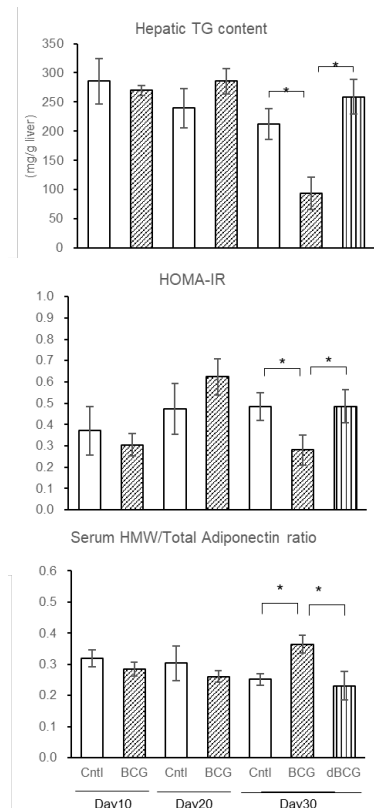


図 1 BCG 菌体（生菌、死菌）投与による肥満病態変動

Cntl: 対照群、BCG: BCG 生菌投与群、dBCG 死菌投与群

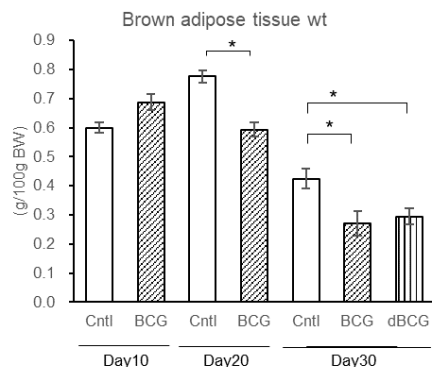


図 2 BCG 菌体（生菌、死菌）投与による褐色脂肪組織重量

Cntl: 対照群、BCG: BCG 生菌投与群、dBCG 死菌投与群

分によって齎されていることも本研究によって明らかとなった。3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと完全に分化させた後に 10 日間 BCG 菌体と共培養すると細胞内の脂質蓄積量は減少していた。また、脂肪細胞特異的な遺伝子である FABP4 や Adipoq の発現も低下しており、これらは転写因子である PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  の発現低下によって齎されることが示された。次に完全に脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞を BCG 菌体で 24 時間処理した際の遺伝子発現について網羅的に解析を行った。その結果においては、先述の遺伝子発現は BCG 菌体処理によって低下していたことは勿論ではあるが、脂質代謝に関する（脂質合成系ならびに脂質分解系）遺伝子発現はその全てにおいて減少していた。遺伝子発現が二倍程度低下した遺伝子は約 70 種であったが、発現が二倍以上亢進したものは約 180 遺伝子あった。更には遺伝子発現が五倍以上にも高まるものは約 50 遺伝子あり、その殆どが免疫調節に関連する遺伝子であった。

以上の結果より、BCG 菌は白色脂肪細胞に対してその機能を大きく変動させて、特に脂肪細胞の脂質蓄積能を低下させて肥満病態を改善する可能性が示された。その一方では、脂肪細胞のケモカインや炎症性アディポカインの発現が大きく高まることから、BCG 菌体投与によっては白色脂肪組織への免疫担当細胞の流入ならびに炎症状態が誘導されて、肥満病態が増悪化する可能性も示された。肥満病態マウスに対して BCG 菌体を投与した際には、白色脂肪組織重量の低下は殆ど認められず、その一方ではインスリン抵抗性や脂肪肝の改善が認められたことから、培養細胞系ではその分子機序の解明は難しいことがうかがえる。肥満病態の変動と生体内における細胞学的変化について追尾した際には肥満病態改善と免疫変動が同時期に認められることから、抗 BCG 菌免疫能の活性化、特に獲得免疫系が肥満病態の改善に関与していることが示唆される。日本においては抗結核ワクチンとして BCG 菌を利用しており、この点が日本の肥満健康問題にどのように影響しているのかは興味深いところである。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織