

機関番号：24402

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790130

研究課題名 (和文) 低酸素下での結核菌感染マクロファージにおける HIF-1 α の機能解明研究課題名 (英文) Essential role of HIF-1 α in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophage

研究代表者

岡 真優子 (OKA MAYUKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40347498

研究成果の概要 (和文)：我々は、ヒト肺肉芽腫に hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) タンパク質の発現が高いことを明らかにし、HIF-1 α 活性化に伴い誘導された遺伝子が、マクロファージおよび結核菌へ与える影響を検討した。Interferon- γ (IFN- γ) 存在下で野生型および HIF-1 α 欠損 (KO) マクロファージに結核菌を感染させた後の菌の生存率は、野生型より KO マクロファージの方が高かった。このとき、KO に比べ野生型マクロファージでの種々の解糖系酵素の発現は高かった。さらに、低グルコース下における細胞内結核菌の生存率は、高グルコース下に比べ低かった。本研究成果から、宿主内での結核菌の増殖は、マクロファージに発現する HIF-1 α の影響を受け、さらに解糖系酵素の亢進が菌の増殖を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein expressed in mouse pulmonary granulomas 6 weeks after infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and the expression colocalized with that of *M. tuberculosis* antigen. Thus we focused to a role of HIF-1 α into macrophages accumulated in granulomas. Our resulted investigated that the survival of *M. tuberculosis* in bone marrow derived macrophages (BMDM) from HIF-1 α deficient mouse (HIF-1 α ^{-/-}) is enhanced, compared with that in wild type BMDM (WT), which are post-stimulated with interferon- γ (IFN- γ) after infected with *M. tuberculosis* H37Rv. When infected with bacillus, the mRNA levels of 6 kinds of glycolytic enzymes were elevated in WT compared with HIF-1 α ^{-/-}. In this study, we suggested that an increase of bacillus is controlled by HIF-1 α .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌・感染症

科研費の分科・細目：6805

キーワード：低酸素、結核、HIF-1 α 、マクロファージ、肉芽腫

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る。年間に約 200 万人が死亡する最大の細菌感染症であるが、結核の発病と組織内酸素分圧は密接な関係がある。結核菌はマクロファージなどに寄生する細胞内寄生菌で、現在、人類の 1/3 に感染しているが、生体内で増殖期と休眠期の二相性の形態をとることが知られている。現行の抗結核薬は、増殖期結核菌には有効であるが、休眠期結核菌（休眠菌）に対して治療効果を示さない。休眠菌は、高齢や免疫不全をきっかけに再び活発化して増殖を始めること（内因性再燃）が知られており、結核の根絶には休眠菌に効果を示す治療薬の開発が必要である。しかし、結核菌の休眠する詳細な機構や内因性再燃のメカニズムについては明らかでない。近年、結核菌の休眠には低酸素や一酸化窒素（NO）の関与することが明らかにされたことから、結核肉芽腫に持続潜伏感染する結核菌にとってマクロファージ内の酸素濃度が休眠の 1 つの要因になっていると考えられる。

マクロファージでは、低酸素状態で低酸素応答転因子 hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が発現し活性化することが知られており、結核菌が持続潜伏感染する肉芽腫のマクロファージにも HIF-1 α タンパク質の発現している可能性が推察された。HIF-1 α タンパク質は酸素存在下でユビキチン化を受け 26S プロテアソームによる分解を受ける。一方、低酸素下でユビキチン化から逃れた HIF-1 α タンパク質は、安定化されて核内へ移行し aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成

し転写因子 HIF-1 として活性化される。予備的研究において申請者は、肺結核肉芽腫における HIF-1 α の発現を免疫組織染色法で明らかにしている。しかし、病巣部に集積するマクロファージと持続潜伏感染する結核菌に対する HIF-1 α の役割については全く明らかにされていない。そこで、申請者は、HIF-1 α の役割について検討する。

2. 研究の目的

結核菌感染マクロファージの HIF-1 α が、マクロファージに持続潜伏感染する休眠菌の機能に様々な影響を与えていると考え、結核菌感染マクロファージに発現する HIF-1 α に着目して、これまで不明であった結核菌の休眠への機構および休眠期での生態について明らかにすることを目的とする。具体的には、① 結核菌によるマクロファージ内での HIF-1 α の活性化、② 結核菌感染による遺伝子の誘導、③ 結核菌のマクロファージへの感染と増殖について検索した。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス（野生型；WT）骨髄由来単球を単離して、マウス線維芽細胞 L292 の培養上清を含む培地で 7 日間培養してマクロファージへと分化させた。同様に、HIF-1 α 欠損 (KO) マクロファージは HIF-1 $\alpha^{lox/lox} \cdot Cre^{+/-}$ マウスの骨髄由来単球を単離して分化させた。感染実験は、ヒト型結核菌 H37Rv を 12 時間感染 (MOI 0.5) 後、500 U/ml Interferon- γ (IFN- γ) 含有培養液で培養した。

結核菌感染 24 時間後、WT および KO マクロファージから RNA を抽出してマイクロアレイ法 (Gene Chip 1.0 ST Array System

for mouse (Affymetrix)) により各々の遺伝子発現変化を比較した。また、real-time PCR法を用いて経時的な遺伝子発現の変化を検討した。

HIF-1 α タンパク質の発現は、ヒト型結核菌感染 4 週～6 週間後のホルマリン固定したマウス肺組織を用いて免疫組織染色法により検索した。また、ヒト型結核菌およびウシ型結核菌弱毒株 (BCG) を感染させたマクロファージの HIF-1 α タンパク質の発現を Western blot 法にて検討した。

WT および KO マクロファージにヒト型結核菌を感染後、500 U/ml IFN- γ 含有培地で 0-10 日間培養した時の結核菌増殖について検討した。マクロファージ内の結核菌量は、0.5% Tween20 溶液で細胞を溶解させた後、7H11 固形培地に蒔き CFU を算出した。

4. 研究成果

感染マクロファージでの HIF-1 α の発現

ヒト型結核菌 H37Rv を感染 4 週～6 週間後、マウス肺組織をホルマリン固定してパラフィン切片を作製した。免疫組織染色法により抗 HIF-1 α 抗体で反応させた後、DAB により発色させた。感染 5 週間および 6 週間後のマウス肺肉芽腫に HIF-1 α の発現が見られ、この発現と結核菌 (チールニールゼン染色) の局在性が一致した。一方、感染4週後に形成された肺肉芽腫に HIF-1 α は発現していなかった。次に、ヒト型結核菌ならびにBCG を感染させたヒト白血病由来単球 (THP-1) マクロファージおよびマウス WT マクロファージにおいて、HIF-1 α 発現が増大した。

感染マクロファージでの遺伝子の発現変化

そこで、HIF-1 α に着目し、マクロファージの遺伝子発現の変化および宿主内での結核菌の生存を検討した。まず、結核菌感染後

の WT および KO マクロファージに発現する遺伝子をマイクロアレイ法にて比較した。その結果、代謝 (16.4%)、細胞内シグナル (10.9%) および転写 (10.7%) の各々に関する遺伝子群に含まれる遺伝子の発現が著しく低下していた。一方、細胞内シグナル群に含まれる遺伝子の多く (30%) は、WT に比べ KO マクロファージでも発現上昇していた。マイクロアレイの結果より、KO マクロファージでは WT に比べて代謝に関わる遺伝子の多くが発現低下していることが明らかになった。また、マイクロアレイ法および real-time PCR 法の結果において、結核菌感染後の HIF-1 α の発現増大に伴って 6 種の解糖系酵素の発現が、KO に比べ WT マクロファージで増大していた。

マクロファージ内での結核菌の増殖

次に、HIF- γ 存在下で WT および KO マクロファージに結核菌を感染させた後、菌の増殖について検討した。感染 6-10 日後における宿主内での菌の生存率は、IFN- γ 非存在下に比べて存在下の方が低く、特に KO より WT マクロファージの方が低かった。IFN- γ は、結核菌の重要な殺菌因子である NO の分泌を促すことが知られていることから、WT および KO マクロファージでの NO 合成酵素 (iNOS) の発現を比較した。その結果、iNOS mRNA の発現誘導は、両者で同程度みられた。さらに iNOS mRNA の阻害剤 (L-NAME) は KO マクロファージ内での結核菌の生存率を増大させた。以上のことから、KO マクロファージ内では野生型と同様に IFN- γ 存在下で NO が産生されていると考えられた。

一方、感染 WT マクロファージにおいて解糖系酵素の誘導が見られたことから、グルコースの結核菌増殖に与える影響を検討した。低グルコース下における細胞内結核菌の生

存率は、高グルコース下に比べ低かった。

以上のことから、マクロファージのグルコース代謝が細胞内での結核菌の生存に重要な要因となる可能性が示唆された。

本研究結果から、宿主内での結核菌の増殖は、マクロファージに発現する HIF-1 α によって抑制されており、さらに解糖系の代謝亢進が菌の増殖を抑制する可能性が示唆された。

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3件) (すべて査読有り)

- 1) **Osada-Oka M**, Hashiba Y, Akiba S, Imaoka S, Sato T.: Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α under hypoxia: Contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization. *FEBS Lett.* 2010 Jul;584(14):3073-3079
- 2) Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Aoki T, **Osada-Oka M**, Tateishi Y, Hisaeda H, Nishiuchi Y, Harada N, Kobayashi K, Matsumoto S. Transient role of CD4+CD25+ regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int. Immunol.* 2010 Mar;22(3):179-89.
- 3) Shinkawa H, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, **Osada-Oka M**, Kubo S, Okada S, Suehiro S. S-allylcysteine is effective as a chemopreventive agent against porcine serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Osaka City Med. J.* 2009, Dec;55(2):61-69.

[学会発表] (計9件)

- 1) 岡 真優子 : 結核菌感染マクロファージのグルコース代謝調節を担う hypoxia-inducible factor-1 α の役割. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第9回感染症沖縄フォーラム (沖縄), 2011. 2.
- 2) **Mayuko Osada-Oka**. Clinical practice for the diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: 14th

International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim: Next Generation Diagnostics for Infectious Diseases. (Penang, Malaysia), 2010. 10

- 3) **Mayuko Osada-Oka**. A histon-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activities: ferric iron storage and ferrous iron oxidation. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Awaji, Japan), 2010. 9.
- 4) **Mayuko Osada-Oka**. Identification of a novel ferritin-like protein in *Mycobacterium*. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, USA), 2010. 7.
- 5) 岡 真優子 : Mycobacterial DNA-binding protein-1 の新機能—鉄の酸化活性と貯蔵性—. 第63回日本酸化ストレス学会学術集会 (横浜), 2010. 6.
- 6) 岡 真優子 : 潜在性結核の診断法の確立に向けた臨床への橋渡し研究 ; 第1報. 第83回日本細菌学会総会 (横浜), 2010. 3.
- 7) 岡 真優子 : 潜在性結核に対する液性免疫応答の解析. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第8回感染症沖縄フォーラム (沖縄), 2010. 2.
- 8) 岡 真優子 : 低酸素状態での HIF-1 α 安定化におけるグルコースの作用機構. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 2009. 12.
- 9) **Mayuko Osada-Oka**. Identification of a novel ferritin-like protein in *Mycobacterium*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Awaji, Japan), 2009. 9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 真優子 (OKA MAYUKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号 : 40347498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし