

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08466

研究課題名(和文) ブルーリ潰瘍における抗酸菌による末梢神経障害機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of peripheral nerve damage by *Mycobacterium ulcerans* in Buruli ulcer

研究代表者

後藤 正道 (GOTO, MASAMICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80325779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Buruli潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans*によって引き起こされる慢性皮膚疾患であり、病変の無痛性を特徴とする。*M. ulcerans*は毒性の脂質Mycolactoneを産生する。今回、培養したシュワン細胞株SW10と線維芽細胞株L929へのMycolactoneの細胞毒性を比較し、SW10においてMycolactoneA/BがL929よりも高い細胞死およびアポトーシスを誘導することを見出した。これらの結果は、無痛性の原因が細胞傷害性にあることを証明しており、MycolactoneがBuruli潰瘍の神経損傷の生成における重要な物質であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Buruli ulcer is a chronic painless skin disease caused by *Mycobacterium ulcerans*. The local nerve damage induced by *M. ulcerans* invasion is similar to the nerve damage evoked by the injection of mycolactone in a Buruli ulcer mouse model. In order to elucidate the mechanism of this nerve damage, we tested and compared the cytotoxic effect of synthetic mycolactone A/B on cultured Schwann cells, fibroblasts and macrophages. Mycolactone induced much higher cell death and apoptosis in Schwann cell line SW10 than in fibroblast line L929. These results suggest that mycolactone is a key substance in the production of nerve damage of Buruli ulcer.

研究分野：病理学

キーワード：Mycolactone 神経傷害機構 シュワン細胞 ブルーリ潰瘍

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌は自然界に広く分布し、それらの一部は人への病原性が判明しているものの、まだ未解明のものも多い。ブルーリ潰瘍(Buruli ulcer)は、アフリカとオーストラリアを中心に30ヶ国以上から報告されている、*Mycobacterium ulcerans* (*M. ulcerans*)感染によって無痛性の皮膚潰瘍が形成される難治性の疾患である。大きく深い潰瘍が形成され、重篤な身体後遺症を残すことが多いことから、病態の解明や治療法の確立が望まれている。WHOは、結核、ハンセン病に次ぐ重要な抗酸菌感染症としてブルーリ潰瘍の対策を行っており、医学的な研究、公衆衛生及び社会的支援を世界中の協力で進めている。

日本においては、*M. ulcerans*の亜種である *Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense* の感染症例が2012年までに32例報告されているが、ここ数年のものが多く、日本各地からの報告がさらに増えつつある。

病態の解明と治療法の確立が望まれているが、ブルーリ潰瘍では巨大な潰瘍にもかかわらずほとんど痛みがない理由は全くわかっていなかった。我々は、これまでのハンセン病における神経障害についての研究経験を元に、この問題に取り組んでいる。

我々は、ブルーリ潰瘍に対する化学療法を開発する目的の動物実験を行う過程において、未治療の *M. ulcerans* 感染マウスを詳細に検索し、これまで全く記載されていない末梢神経内への抗酸菌の侵入と病変部の知覚低下を発見した。これは、「末梢神経を侵す抗酸菌はハンセン病の起因菌 *M. leprae* のみ」という医学常識を覆すものであった。

さらに、有髄シュワン細胞の空胞変性も観察されたが、この病変の成立機序として、我々は *M. ulcerans* が産生する毒性脂質 mycolactone の関与を推測し、mycolactone の神経傷害性を検討するために、マウスの足底に精製 mycolactone A/B を注射して、知覚検査と組織学的検索を行った。その結果、一定以上の量の mycolactone (30-200 µg/footpad) を注射すると、菌の接種と同様の足底の腫大が起こり、接種初期には知覚過敏になるものの、徐々に知覚鈍麻が起こること、形態学的には有髄線維の脱落と髄鞘の再生などを明らかにした。

さらに、*M. ulcerans* の産生する mycolactone が末梢神経シュワン細胞にアポトーシスを引き起こすことが培養細胞への mycolactone 接種実験で明らかになり、脂肪細胞や線維芽細胞と比較してシュワン細胞の mycolactone 感受性が高いことも確認できている。

2. 研究の目的

ブルーリ潰瘍(Buruli ulcer)は我が国でも報告が増加している抗酸菌 *Mycobacterium ulcerans* 感染症であり、深い無痛性の皮膚潰瘍が形成される。ブルーリ潰瘍では末梢神経

病変が起きること、菌由来の毒性脂質 mycolactone の投与と同様の末梢神経障害が起きることを我々は見出した。

本研究ではこれらの研究を発展させ、培養シュワン細胞への mycolactone 投与による細胞障害とその成立機序を検索することにより、ブルーリ潰瘍における無痛性病変成立のメカニズムを明らかにし、神経障害機構を解明することでブルーリ潰瘍の病態の解明と治療への展望が明らかになる。また、ブルーリ潰瘍における無痛性の解明をはかることにより、末梢神経における痛覚の生理的機序を解明していくことにもつながる。

3. 研究の方法

ブルーリ潰瘍における無痛性病変成立のメカニズムを解明するため、以下の研究を行った。

1) 線維芽細胞(L929)、マクロファージ(J774)、培養シュワン細胞(SW10)へ mycolactone を投与して、細胞形態の変化、細胞膜破損の有無、アポトーシスの有無などの検討することで、先行研究の妥当性について確認する。

化学合成 mycolactone A/B (ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与) を、培養 fibroblast (NCTC clone 929) と macrophage (J774A.1) に投与し、細胞障害を引き起こす mycolactone の量を定める。細胞障害の評価としては、形態学的観察、トリパンブルー染色による細胞膜傷害の定量、固定した細胞の TUNEL 法によるアポトーシスの定量などを行う。

2) アポトーシスに関連したシグナル系の検出として、アポトーシス関連物質である Cleaved Caspase-3 を用いて、

Western blot によるアポトーシスの検出
蛍光抗体法によるアポトーシスの検出を行う。

培養シュワン細胞(SW10)に mycolactone を投与しシュワン細胞の動態についての解析を行う。さらに培養細胞標本を作成して、シュワン細胞の微細構造の変化などの細胞学的解析を行い、mycolactone による末梢神経障害の機序を明らかにする。

4. 研究成果

1) Mycolactone の細胞障害性のトリパンブルー染色と TUNEL 法 (アポトーシスを検出) による定量的解析

[培養シュワン細胞と線維芽細胞への Mycolactone 投与]

SW10 マウスシュワン細胞 (ATCC CRL-2766) を American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、10% ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用いて、CO₂ 濃度 5%、33.0 にて細胞培養を行った。L929 マウス線維芽細胞 (ATCC CCL-1) を ATCC から購入し、10% ウマ血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium を用

いて、CO2 濃度 5%、37.0 にて細胞培養を行った。

ハーバード大学の Prof. Yoshito Kishi より供与された合成した Mycolactone A/B (100% エタノール(ETOH)で 1mg/ml に希釈されたもの)を使用した。

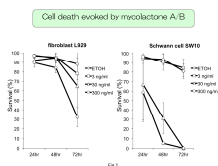
各細胞を 24 時間培養し、300ng/ml、30ng/ml、3ng/ml になるように培地で段階希釈した Mycolactone A/B を各細胞に注入した。

各細胞、培養培地で同様に 300ng/ml の最終エタノール濃度に希釈したエタノールを陰性対照として使用した。

Mycolactone A/B を投与後、24, 48, 72 時間後にトリパンプルー染色及び固定した細胞の TUNEL 法により解析を行った。

〔結果〕

Mycolactone は線維芽細胞とマクロファージにアポトーシスを誘導することが報告されている。我々は、末梢神経の主要な構成細胞であるシュワン細胞に対する Mycolactone の細胞傷害性を、線維芽細胞への傷害性と比較したところ、トリパンプルー染色、TUNEL 法の両方でシュワン細胞は線維芽細胞よりも強い細胞傷害を示し、それにはアポトーシスと壊死の両者が関与している可能性が高くなった。



2) Western blot と蛍光抗体法によるアポトーシスの検出

Mycolactone 投与後短時間において、アポトーシスのシグナル伝達に重要な Cleaved Caspase-3、Phospho-Histone H2A.X の発現を Western blot を用いて検討した。

また、Cleaved Caspase-3 については蛍光抗体法での検出も試みた。

〔細胞への Mycolactone 投与〕

SW10 マウスシュワン細胞 (ATCC CRL-2766) L929 マウス線維芽細胞 (ATCC CCL-1) に加えて、J774A.1 マウスマクロファージ細胞 (ATCC TIB-67)、C2C12 マウス筋芽細胞 (ATCC CRL-1772) Neuro-2a マウス神経芽細胞 (ATCC CCL-131) sNF96.2 ヒトシュワン細胞 (ATCC CRL-2884) 及び HUVEC ヒト内皮細胞 (Lonza CC-2519) についても検出を試みた。

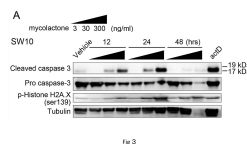
〔結果〕

Western blot : SW10 マウスシュワン細胞では、12 時間後、24 時間及び 48 時間後の Cleaved Caspase-3 及び Phospho -Histone H2A.X でバンドが検出された。L929 線維芽細胞では、Cleaved Caspase-3、Phospho-Histone H2A.X の発現は見られず、-Tubulin は正常に発現していた。

J774A.1 マウスマクロファージ細胞、C2C12 マウス筋芽細胞、Neuro-2a マウス神経芽細胞、sNF96.2 ヒトシュワン細胞、HUVEC ヒト内皮細胞については 24 時間、30ng/ml で比較した。Cleaved Caspase-3 及び Phospho -Histone

H2A.X に関して Neuro-2a マウス神経芽細胞、sNF96.2 ヒトシュワン細胞及び SW10 マウスシュワン細胞に関してバンドが検出された。

Western blotによるアポトーシスの検出



蛍光抗体法 : Mycolactone 投与後 12、24 時間後の Cleaved Caspase-3 の細胞レベルにおける発現を比較したが、Mycolactone 30ng/ml 及び 300ng/ml の 12 時間、24 時間後において、SW10 マウスシュワン細胞に発現を認めた。L929 線維芽細胞においては発現が認められなかった。陽性対照においては SW10 および L929 ともに発現がみられた。

〔考察〕

我々はマウスへの *M. ulcerans* 接種と Mycolactone 投与で末梢神経障害が起きることを報告したが、Mycolactone が神経系細胞に及ぼす影響について、細胞レベルで解析することで機序の解明をしようとしている。最初の実験では、末梢神経障害に最も関与すると思われるシュワン細胞と線維芽細胞に対する Mycolactone の細胞障害性を、トリパンプルー染色と TUNEL 法 (アポトーシスを検出) で定量的に比較したところ、24, 48, 72 時間後のいずれにおいても、シュワン細胞により強い細胞壊死とアポトーシスが認められた。しかし、壊死とアポトーシスが同時に起こることは稀のため、アポトーシスが先行して起こり、二次的に壊死が起こっているのではないかと推測した。そこで、Mycolactone 投与後 12、24、48 時間後を中心に、アポトーシス関連物質の発現についてウェスタンブロットングで検討したところ、Cleaved Caspase-3 は線維芽細胞では検出されなかったが、Mycolactone 30ng/ml と 300ng/ml 投与後 12、24、48 時間のシュワン細胞ではバンドが検出された。また、DNA 損傷時にリン酸化を受け、アポトーシス初期のマーカーと考えられているリン酸化 Histone H2A.X についても、Mycolactone による影響が認められた。培養シュワン細胞と線維芽細胞以外の細胞を用いて、Mycolactone A/B のアポトーシス誘導能を比較検討したところ、Mycolactone A/B は神経に関する細胞について明らかな Cleaved Caspase-3 の発現を誘導した。Mycolactone が神経に関する細胞にアポトーシスを引き起こすことから、ブルーリ潰瘍における無痛性の原因になっていることが示唆された。

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1件)

Junichiro En, Sho Kitamoto, Akira Kawashima, Suguru Yonezawa, Yoshito Kishi, Norihisa Ishii, Masamichi Goto、
Mycolactone cytotoxicity in Schwann cells could explain nerve damage in Buruli ulcer.

PLoS Neglected Tropical Diseases 11(8): e0005834.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005834>

〔学会発表〕(計2件)

後藤正道、圓 純一郎：ブルーリ潰瘍の起因菌から産生される Mycolactone の細胞傷害性について：第 89 回日本ハンセン病学会総会 2016.6.6-8 草津町

圓 純一郎、北本 祥、川島 晃、岸 義人、米澤 傑、石井則久、後藤正道：ブルーリ潰瘍 (M.ulcerans 感染症) における神経障害機構の研究～培養細胞における Mycolactone のアポトーシス誘導について：第 90 回日本ハンセン病学会総会 2017.6.8-10 合志市

〔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

後藤 正道 (GOTO, Masamichi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80325779

(2) 研究分担者

圓 純一郎 (EN, Junichiro)

国際医療福祉大学・成田保健医療学部・講

師

研究者番号：30587879

鈴木 幸一 (SUZUKI, Koichi)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：20206478

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()