

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10031

研究課題名（和文）結核菌由来ManLAMによるスフィンゴ脂質代謝酵素の活性阻害機構

研究課題名（英文）Inhibitory mechanisms of sphingolipid metabolizing enzyme activity by Mycobacterium tuberculosis-derived ManLAM

研究代表者

中山 仁志（Nakayama, Hitoshi）

順天堂大学・医療看護学部・先任准教授

研究者番号：70514933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：結核菌を代表とする抗酸菌の細胞壁には、リポアラビノマンナン（LAM）と呼ばれる糖脂質が存在している。特に、結核菌などのManLAMは食胞の成熟を阻害することが知られているが、その詳細な分子機構はよく分かっていない。研究代表者は、ManLAMがLacCerのクラスター形成に伴うスフィンゴ脂質代謝を阻害し、抗酸菌による細胞内寄生の原因となっているのではないかと仮説を立て、研究を行った。その結果、病原性抗酸菌はManLAMを利用して、LacCerのリピドラフトに存在するスフィンゴ脂質を介した生理活性脂質の産生を抑制して、食胞とリソソームの融合を阻害していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を行ったことで、スフィンゴ脂質代謝酵素及び生理活性脂質が関与する食胞成熟機構の全容解明に近づいた。このような学術的意義だけでなく、本研究では病原性抗酸菌がManLAMを利用してどのようにヒト自然免疫担当細胞内のスフィンゴ脂質代謝へ影響を与え寄生するのかを詳らかにした。そのため本研究成果は、上記メカニズムを標的とした新規病原性抗酸感染症の治療薬や治療法の開発に結び付いており、極めて社会的意義が大きいものである。

研究成果の概要（英文）：Lipoarabinomannan (LAM) is glycolipid that abundantly present in the cell walls of all mycobacterial species, including Mycobacterium tuberculosis. In particular, M. tuberculosis are known to have ManLAM and inhibit phagosome maturation. However, the detailed molecular mechanism is not well understood. The principal investigator hypothesized that ManLAM directly inhibits sphingolipid metabolism associated with LacCer-enriched lipid rafts in mycobacteria-containing phagosomes, resulting in intracellular survival of pathogenic mycobacteria, such as M. tuberculosis. The principal investigator found that pathogenic mycobacteria use ManLAM to inhibit the production of bioactive lipids through LacCer-enriched lipid rafts-dependent sphingolipid metabolism, thereby preventing phagosome maturation.

研究分野：感染症内科学、機能生物化学

キーワード：結核菌 病原性抗酸菌 リポアラビノマンナン ManLAM 自然免疫 スフィンゴ脂質代謝 好中球 食胞成熟

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

結核菌を代表とする抗酸菌の細胞壁には、リポアラビノマンナン (LAM) と呼ばれる糖脂質が存在しており、抗酸菌の生存に必須の分子であることが知られている。LAM は病原性と非病原性抗酸菌との間で末端のキャップ構造が異なる。病原性を有する結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの非結核性抗酸菌はマンノースキャップ型の LAM (ManLAM) を有する一方で、*M. smegmatis* などの非病原性抗酸菌はホスファチジルイノシトールキャップ型の LAM (PILAM) を有することが知られている。また、ManLAM は PILAM とは異なり、食胞の成熟を阻害することが知られているが、その詳細な分子機構はよく分かっていない。

好中球は自然免疫において重要な役割を果たしている。スフィンゴ脂質であるラクトシルセラミド (LacCer) やスフィンゴミエリン (SM) は、これらの細胞に豊富に発現しており、コレステロールや様々なシグナル伝達分子と共に、スフィンゴ脂質代謝の起点となり得るリピドラフト (マイクロドメイン) を形成している。研究代表者はこれまでに、結核菌由来 ManLAM をコートしたポリスチレンビーズをヒト好中球へ取り込ませると、食胞における LacCer のクラスター形成阻害が起こり、シグナル伝達分子である Hck との会合が妨害され、その結果、リソソーム融合が抑制されることを明らかにしている。その一方で、ManLAM がどのように LacCer のクラスター形成阻害を引き起こしているのかについては不明のままである。そこで研究代表者は、'好中球において、ManLAM が LacCer のクラスター形成に伴うスフィンゴ脂質代謝を阻害し、抗酸菌による細胞内寄生の原因となっているのではないか' という仮説を立て、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、食胞におけるスフィンゴ脂質代謝酵素と LacCer のリピドラフトの局在、ManLAM による LacCer クラスター形成阻害とスフィンゴ脂質代謝酵素のリン酸化へ与える影響、さらには、こうしたスフィンゴ脂質代謝酵素の活性変化がスフィンゴ脂質代謝へ与える影響を明らかにすることを目的とした。このような検討を行うことで、病原性抗酸菌が ManLAM を利用してどのようにヒト自然免疫担当細胞内のスフィンゴ脂質代謝へ影響を与え寄生するのかを明らかにし、このようなメカニズムを標的とした薬剤や治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結核死菌、MAC、非病原性抗酸菌、ManLAM あるいは PILAM をコートしたポリスチレンビーズを、好中球へ貪食させ、超解像顕微鏡である STED (誘導放出制御) 顕微鏡を用いて、スフィンゴ脂質代謝酵素群と LacCer の局在を解析した。さらに、生化学的に食胞を分離した後、スフィンゴ脂質代謝酵素群の活性化を解析した。また、食胞の抗 LacCer 抗体による免疫沈降を行った。

(2) 本研究では、スフィンゴ脂質代謝酵素が活性化された結果産生される生理活性脂質を指標として、細胞内におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の活性化を測定する方法を確立した。スフィンゴ脂質の蛍光アナログを予め好中球へ取り込ませた後、菌あるいは LAM コートビーズを取り込ませ、生理活性脂質を含む脂質画分を抽出、高性能薄層クロマトグラフィーにて分離展開した後、産生蛍光生理活性脂質量を定量した。

(3) 好中球系に分化させた急性白血球細胞株である HL60 細胞を用いて、スフィンゴ脂質代謝酵素群の発現を short interfering (si) RNA により抑制した。また、このような細胞における抗酸菌を含む食胞とリソソームとの融合を、リソソームマーカーである LysoTracker を用いて検討した。

4. 研究成果

好中球へ各種抗酸菌あるいは LAM コートビーズを貪食させた後、スフィンゴ脂質代謝酵素群と LacCer に対する特異抗体を用いて免疫染色し、食胞周囲における分子局在を STED 顕微鏡により解析したところ、非病原性抗酸菌や PILAM コートビーズを含む食胞の周囲では、LacCer の大きなクラスターが形成され、さらには、スフィンゴ脂質代謝酵素群が集積していることが分かった。一方で、病原性抗酸菌や ManLAM コートビーズを含む食胞ではそれら分子の局在は分散していることが分かった。さらに、生化学的に食胞を分離した後、スフィンゴ脂質代謝酵素群の活性化を解析したところ、PILAM ビーズを含む食胞では2種類のスフィンゴ脂質代謝酵素の活性化が認められたのに対して、ManLAM ビーズを含む食胞ではそのような活性化は認められなかった。また、抗 LacCer 抗体による食胞の免疫沈降を行ったところ、PILAM ビーズを含む食胞では LacCer のリピドラフトへのスフィンゴ脂質代謝酵素の会合が認められた。しかしながら、ManLAM を含む食胞ではそのような会合は認められなかった。

細胞内におけるスフィンゴ脂質代謝酵素の活性を測定するため、スフィンゴ脂質の蛍光アナログを予め好中球へ取り込ませた後、菌あるいは LAM コートビーズを取り込ませ、生理活性脂質を含む脂質画分を抽出、高性能薄層クロマトグラフィーにて分離展開した後、産生蛍光生理活性脂質量を定量した。その結果、PILAM を含むビーズを取り込ませると、酵素活性の上昇が認めら

れるのに対して、ManLAM を含むビーズを取り込ませてもそのような上昇は認められなかった。またこのような結果は各スフィンゴ脂質代謝酵素特異的な阻害剤を用いた検討によっても裏付けされた。さらに、好中球系に分化させた急性白血病細胞株である HL60 細胞を用いて、スフィンゴ脂質代謝酵素群の発現を si RNA により抑制したところ、非病原性抗酸菌であるにも拘らず、食胞へのリソソーム融合が大きく減少した。以上の結果から、病原性抗酸菌は ManLAM を利用して、LacCer のリポドラフトに存在するスフィンゴ脂質を介した生理活性脂質の産生を抑制して、食胞とリソソームの融合を阻害していることが分かった。

自然免疫細胞が生体内から病原微生物を排除するためには、スフィンゴ糖脂質のリポドラフトや CD11b/CD18 のようなパターン認識受容体を介した貪食機構を抑制するか、細胞内に取り込まれてもスフィンゴ脂質代謝が活性化され食胞成熟が促進されることが重要である。研究代表者はこのような点にも着目し、好中球やマクロファージによる抗酸菌の貪食を特異的に抑制する抗体を見出すとともに、この抗体機能は血清により活性化されることを発見した。

今後は、スフィンゴ脂質代謝酵素により産生される生理活性脂質が食胞とリソソームとの融合にどのような役割を果たしているのかを明らかにする予定である。実際既に研究代表者は予備検討を行うことで、この生理活性脂質がある種のタンパク質へ特異的に会合することを明らかにしている。このように、スフィンゴ脂質代謝酵素及び生理活性脂質が関与する食胞成熟機構の全容解明とともに、上記に示した抗体がどのように食胞成熟機構へ関与するか網羅的に解析することで、新規病原性抗酸菌感染症治療薬の開発に結びつけたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hitoshi Nakayama, Kei Hanafusa, Kazuhisa Iwabuchi	4. 巻 MIMB 2613 : Glycolipids
2. 論文標題 Biochemical and microscopic analyses for sphingolipids and its related molecules in phagosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 203-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2910-9_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kota Nakamura, Hitoshi Nakayama, Shinichi Sasaki, Kazuhisa Takahashi, Kazuhisa Iwabuchi	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Mycobacterium avium-intracellulare complex promote release of pro-inflammatory enzymes matrix metalloproteinases by inducing neutrophil extracellular trap formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09017-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuhisa Iwabuchi, Hitoshi Nakayama, Kei Hanafusa	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Lactosylceramide-enriched microdomains mediate human neutrophil immunological functions via carbohydrate-carbohydrate interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 239-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10060-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hitoshi Nakayama, Eriko Oshima, Tomomi Hotta, Kei Hanafusa, Kota Nakamura, Noriko Yokoyama, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori, Kazuhisa Iwabuchi	4. 巻 132
2. 論文標題 Identification of anti-lipoarabinomannan antibodies against mannan core and their effects on phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tuberculosis (Edinb)	6. 最初と最後の頁 102165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tube.2022.102165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noriko Yokoyama, Kei Hanafusa, Tomomi Hotta, Eriko Oshima, Kazuhisa Iwabuchi, Hitoshi Nakayama	4. 巻 22(3)
2. 論文標題 Multiplicity of Glycosphingolipid-Enriched Microdomain-Driven Immune Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hitoshi Nakayama, Kazuhisa Iwabuchi	4. 巻 31
2. 論文標題 Glycosphingolipid-Enriched Lipid Rafts-Mediated Pathogen Recognition Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E141-E149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1766.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama H, Nagafuku M, Suzuki A, Iwabuchi K, Inokuchi JI	4. 巻 592
2. 論文標題 The regulatory roles of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in immune systems	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 3921-3942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件(うち招待講演 6件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 中山仁志
2. 発表標題 スフィンゴ脂質による自然免疫機能の制御
3. 学会等名 第15回セラミド研究会学術集会・第16回スフィンゴセラピー研究会合同年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山仁志, 花房慶, 山地俊之, 大嶋恵理子, 岩淵和久
2. 発表標題 マンナンコアに対するIgM抗体の同定ならびにそれらが貪食細胞による抗酸菌の貪食過程へ与える影響.
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山仁志, 花房慶, 堀田知美, 大嶋恵理子, 岩淵和久
2. 発表標題 病原性抗酸菌によるスフィンゴ脂質代謝抑制を利用した殺菌回避機構について
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山仁志, 花房慶, 山地俊之, 大嶋恵理子, 堀田知美, 岩淵和久
2. 発表標題 抗リボアラビノマンナン抗体の結合特異性ならびに自然免疫細胞による抗酸菌貪食への効果に関する検討
3. 学会等名 第6回糖鎖免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山仁志, 花房慶, 堀田知美, 大嶋恵理子, 岩淵和久
2. 発表標題 抗酸菌感染における食胞膜マイクロドメインを介したスフィンゴ脂質代謝について
3. 学会等名 第15回スフィンゴセラピー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村洸太, 中山仁志, 佐々木信一, 岩淵和久
2. 発表標題 NETsと非結核性抗酸菌症の病原性について
3. 学会等名 第5回抗酸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上和哉, 渡邊真衣, 花房慶, 中山仁志, 岩淵和久, 田中浩士
2. 発表標題 結核菌の殺菌回避に関わる (1,2)マンナン(ManCap)の合成とその機能評価
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山仁志, 堀田知美, 大嶋恵理子, 花房慶, 中村洸太, 岩淵和久
2. 発表標題 病原性抗酸菌がヒト好中球のファゴソームにおけるスフィンゴ脂質代謝へ与える影響について
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会(Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田遥香, 杉山寛崇, 花房慶, 中山仁志, 岩淵和久, 田中浩士
2. 発表標題 抗酸菌感染阻害作用を有する (1, 2)分岐マンナン誘導体の合成研究
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花房慶, 中山仁志, 山地俊之, 岩淵和久
2. 発表標題 ヒトマクロファージにおいて極長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ脂質は免疫応答を制御する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花房慶, 中山仁志, 山地俊之, 岩淵和久
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸鎖を含むスフィンゴ脂質によるマクロファージの免疫応答制御について
3. 学会等名 第13回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花房慶, 中山仁志, 山地俊之, 岩淵和久
2. 発表標題 ヒトマクロファージの免疫応答における極長鎖脂肪酸鎖を含むスフィンゴ脂質の役割
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山仁志, 岩淵和久
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質が作り出す機能構造による自然免疫制御機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会シンポジウム “生物学と化学による糖が付加された脂質の理解と制御に向けて” (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山仁志, 堀田知美, 中村洸太, 岩淵和久
2. 発表標題 病原性抗酸菌がヒト好中球のスフィンゴ脂質代謝機構へ与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama H
2. 発表標題 Sphingolipid-mediated signaling in mycobacteria-infected phagocytes
3. 学会等名 1st Japan-Europe Workshop on Glycosphingolipids and Membrane Homeostasis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山仁志, 横山紀子, 岩淵和久
2. 発表標題 リボ多糖によるスフィンゴ糖脂質の脂質ラフトを介した炎症誘導機構
3. 学会等名 第38回日本糖質学会, ワークショップ「糖脂質を基軸とした横展開」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama H, Yokoyama N, Iwabuchi K
2. 発表標題 Role of LacCer in LPS-mediated innate immunological functions
3. 学会等名 25th International Symposium on Glycoconjugates (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama H, Iwabuchi K
2. 発表標題 Sphingolipid metabolic pathways play essential roles in the fusion of lysosomes to Mycobacterium-containing phagosomes
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山仁志、岩淵和久
2. 発表標題 ヒト好中球における病原性抗酸菌によるスフィンゴ脂質代謝阻害
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会(東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山仁志、横山紀子、堀田知美、岩淵和久
2. 発表標題 ラクトシルセラミドの脂質ラフトを介したヒト好中球の炎症応答
3. 学会等名 第37回日本糖質学会(仙台)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山仁志、堀田知美、中村洸太、岩淵和久
2. 発表標題 CD14とCD11b/CD18はラクトシルセラミドの脂質ラフトを利用することでヒト好中球の炎症応答を仲介する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山仁志、横山紀子、堀田知美、岩淵和久
2. 発表標題 抗酸菌によるヒト貪食細胞におけるスフィンゴ糖脂質のラフトを介したシグナル伝達への影響
3. 学会等名 第11回セラミド研究会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山仁志、岩淵和久
2. 発表標題 ラクトシルセラミドはヒト好中球におけるCD14を介したNF- B活性化と貪食反応に関与する
3. 学会等名 第36回日本糖質学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山仁志、栗原秀剛、堀田知美、岩淵和久
2. 発表標題 極長鎖脂肪酸 (C24) を含むラクトシルセラミドはヒト好中球によるCD14を介した貪食に必要である
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山仁志、岩淵和久
2. 発表標題 抗酸菌によるスフィンゴ脂質代謝阻害機構
3. 学会等名 第2回抗酸菌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山仁志、岩淵和久
2. 発表標題 ヒト好中球におけるLPS応答はラクトシルセラミドのリピドラフトにより仲介される
3. 学会等名 糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayama H, Iwabuchi K
2. 発表標題 Sphingolipid-mediated signaling pathways play essential roles in Mycobacterium-containing phagosomes maturation
3. 学会等名 The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中山仁志	4. 発行年 2022年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 4
3. 書名 FOOD STYLE 21 2022年11月号 自然免疫におけるスフィンゴ脂質の役割	

1. 著者名 中山仁志、岩淵和久	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 The Lipid 2022年4月号 病原微生物に対する自然免疫応答に脂質がどのように関与するか	

1. 著者名 中山仁志, 岩淵和久	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 8
3. 書名 セラミド研究の新展開 第15章 ラクトシルセラミドを介した免疫機能	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------