

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390112

研究課題名（和文） オートファジーによる細胞内感染防御システムと肉芽腫形成機構

研究課題名（英文）

研究代表者

江石 義信（EISHI YOSHINOBU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70151959

研究成果の概要：

原因不明の全身性肉芽腫疾患サルコイドーシスの病因に細胞内感染型アクネ菌の関与が疑われている。本研究では、アクネ菌の細胞内感染や細胞内増殖によりオートファジーが誘導されること、およびサルコイドーシス病変部においては、アクネ菌の潜伏感染と細胞内増殖過程にオートファジーが関与していることを明らかにした。これらの研究成果から、アクネ菌の細胞内増殖に伴う急激なオートファジーの誘導により過敏性免疫反応が誘導されサルコイドーシス肉芽腫が形成されるものと推察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	0	6,200,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	2,490,000	16,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：オートファジー、*P. acnes*、肉芽腫形成、細胞内感染、LC3、LAMP-1、Bafilomycin、Th1型過敏性免疫反応

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスの病変部組織から皮膚の常在菌として知られる *Propionibacterium acnes*（アクネ菌）が高率多量に培養される。また病変部肉芽腫内には本菌 DNA が集積して認められることから、サルコイドーシスの原因細菌としてアクネ菌が想定されている。常在菌によって引き起こされる疾病は内因性感染症と呼ばれ、その発症機構には免疫能低下に伴う日和見感染だけでなく、宿主のア

レルギー素因が関与しうる病態も存在する。「アクネ菌の細胞内持続感染の成立」と「本菌に対する Th1 型過敏性免疫反応の存在」がサルコイドーシス病因論の本質であると考えているが、その成因となる菌側および患者側の要因はいまだ解明されていない。菌側の要因としては、潜伏感染菌の内因性活性化に伴う細胞内増殖現象を、宿主側の要因としては、オートファジーを介した MHC クラス II 抗原提示による Th1 型免疫反応の亢進を想定

し以下の研究を行った。

2. 研究の目的

- (1)アクネ菌の細胞内感染がオートファジーを誘導しうるか否かを明らかにする。
- (2)サルコイドーシス病変形成にオートファジーが関与しうるか否かを明らかにする。
- (3)サルコイドーシス患者におけるオートファジーおよび自然免疫機能異常の解析と遺伝子多型との関連を明らかにする。
- (4)アクネ菌の潜伏感染モデルを作成する。

3. 研究の方法

- (1) オートファジーの特異的マーカーである LC3 蛋白を遺伝子導入した HeLa 細胞に細胞侵入能を有するアクネ菌を感染させ、細胞内アクネ菌の局在を経時的に追った。Rab5、LAMP-1 をマーカーにした蛍光顕微鏡下および電子顕微鏡下での観察を行うことにより細胞内感染後の動態解明およびオートファジーの関与についての検討を行った。また、アクネ菌の細胞内増殖と同様の状況を実験的に再現する為に、リソソーム阻害剤である Bafilomycin を添加しあと、同様な方法で細胞内アクネ菌の変化を観察した。
- (2) パラフィン切片でも使用可能な LC3 蛋白に対するモノクローナル抗体を作製した。免疫原としてヒト LC3B リコンビナント蛋白を用い、抗体作成時のスクリーニングとして 293T 細胞に LC3 をトランジェントに強制発現させたものと、LC3 の発現が高いとされているヒト小脳のホルマリン固定パラフィン切片を用いて陽性に示すものを選別した。作成した抗体は市販のポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とを通常時および飢餓状態の HeLa 細胞のパラフィン切片にて比較検討を行った。本抗体を用いてサルコイドーシス病変部リンパ節のパラフィン切片に対する免疫組織化学的な検討を行った。
- (3) NOD1 と NOD2 遺伝子を上皮細胞株 (293T 細胞) に発現させたあとアクネ菌を細胞内感染させ、ルシフェラーゼアッセイにてその活性化を検索した。オートファジー関連遺伝子として ATG5 遺伝子を、また自然免疫系関連遺伝子として NOD1 遺伝子を direct sequencing 法および allelic discrimination 法を用いて解析した。
- (4) SCID (重症複合免疫不全) マウスを用いてリステリア菌の細胞内持続感染モデルが報告されており、本研究でもこの報告と同様の方法を用いてアクネ菌の細胞内持続感染が成立しうるか検討を行った。SCID マウスに 1×10^8 個のアクネ菌生菌を静注し、肝臓と脾臓における菌量の経時変化を細菌培養、本菌特異的 Real Time PCR 法、本菌特異的なモノクローナル PAB 抗体に

よる免疫染色法で解析した。

4. 研究成果

- (1) 蛍光および電子顕微鏡観察の結果から、細胞内に感染したアクネ菌はエンドソーム・リソソーム系で細胞質に出ることなく消化されていたが(図2矢印)、一部の菌体は感染後 16-18 時間をピークに LC3 陽性膜に捕われていることが明らかとなった(図2矢頭)。Bafilomycin 存在下ではファゴソームのマーカーである LAMP-1 陽性の巨大化空胞から菌体が抜け出ており、LC3 に囲まれた菌体が増加していた。また、電顕からもこの巨大化した LAMP-1 内の菌体が消化を逃れている様子が観察された(図1, 2, 3)。

図1：エンドサイトーシスによるアクネ菌の細胞内侵入 (赤:菌体 緑:Rab5) 2hr 後

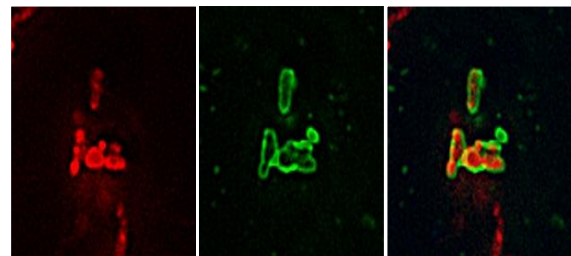


図2：LC3 に取り囲まれたアクネ菌の出現 (赤:菌体 緑:LC3 青:LAMP-1) 24hr 後

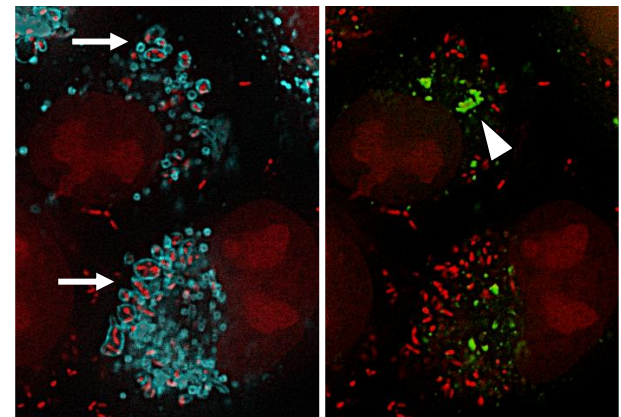
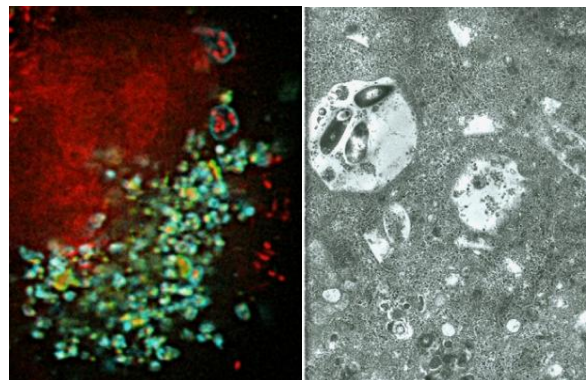


図3：Bafilomycin 添加によるオートファジーの亢進 (蛍光色は同上、右：電顕) 24hr 後



(2) パラフィン切片において、LC3 強制発現細胞(写真左)と小脳プルキンエ細胞(右)に強陽性となる抗体を作成した(図4)。本抗体は通常時(左)に比べて飢餓状態の HeLa 細胞(右)の細胞質に多数の顆粒状陽性を認め(図5)、市販抗体との比較ではポリクローナル抗体と同等の陽性所見であった。市販モノクローナル抗体については陰性であった。サルコイドーシスのリンパ節では9例中1例で肉芽腫内に陽性を認めた。陽性例では類上皮細胞質内に顆粒状の陽性を示し、一部でリング状陽性も認めた。また一部の HW 小体および細胞内増殖した *P. acnes* 感染マクロファージにおいても強い陽性を認めた(図6)。

図4：クローン選別に用いたパラフィン切片

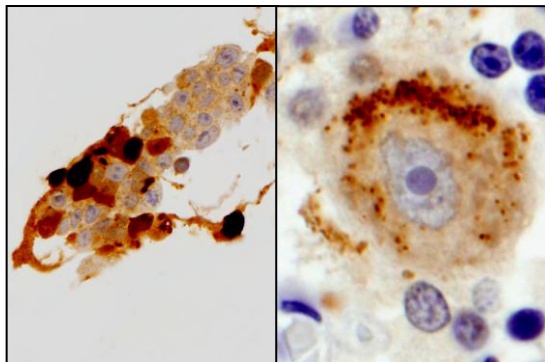


図5：飢餓状態での LC3 陽性細胞の染色像

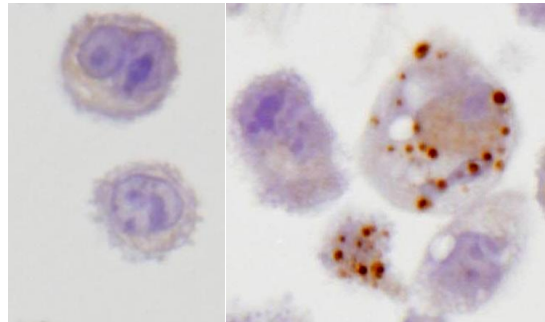
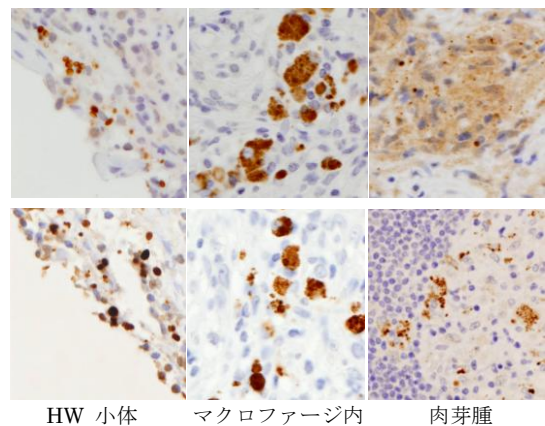


図6：サルコイドーシス病変部における LC3 とアクネ菌の局在様式の類似性
免疫染色(上段:LC3 抗体 下段:PAB 抗体)



HW 小体 マクロファージ内 肉芽腫

(3) アクネ菌細胞内感染が NOD2 および NOD1 を活性化することが明らかとなった。また、NOD1 遺伝子 796 番塩基がアミノ酸置換をともなつて、G から A に変異するとアクネ菌細胞内感染に対する抵抗力が、有意に低下することが明らかになった。ATG5 遺伝子の変異に関しては見出せなかった。

図7：NOD1 遺伝子多型とサルコイドーシス

Genotype	Odds ratio (95%CI) for sarcoidosis
Dominant model	
G/G	1
G/A or A/A	2.497 (1.235, 5.046), P=0.011
Per allele	
G/G	1
G/A	2.250 (1.084, 4.670)
A/A	3.243 (1.402, 7.502)
Per allele	1.769 (1.182, 2.647), P=0.006

(4) 通常の BALB/c マウスにおいては、培養での解析で4週目まで菌量の急激な減少を認めその後は検出が困難であった。免疫染色でも同様に4週目以降では検出が困難であった。他方 SCID マウスにおいては24週経過後も4週目と同量のアクネ菌が培養された。免疫染色では4週目以降も菌の減少は続いたが、23週が経過しても小型円形の陽性所見が認められた。PCR による解析では経時的な減少は認められなかった。23週経過後に免疫染色で認められた陽性像の多くは培養で検出された菌であり、その一部は viable but non-culturable (VBNC) の状態である可能性が考えられた。

図8：感染後の培養可能なアクネ菌数の経過

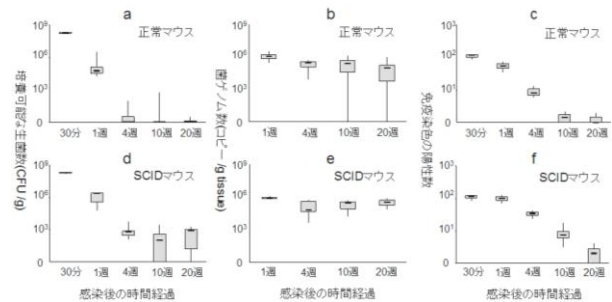
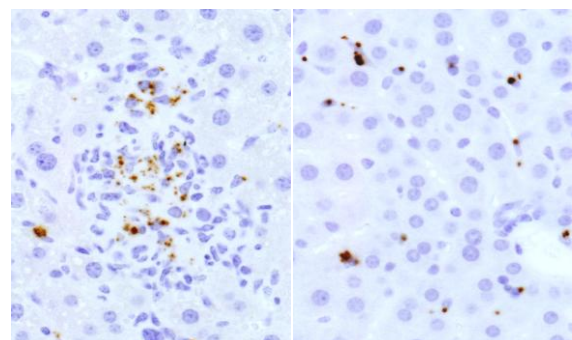


図9：SCID マウス肝臓での潜伏感染の成立
PAB 抗体による免疫染色(左:1週 右:4週)



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 10 件)

- ① Furukawa A, Uchida K, Ishige Y, Ishige I, Kobayashi I, Takemura T, Yokoyama T, Iwai K, Watanabe K, Shimizu S, Ishida N, Suzuki Y, Suzuki T, Yamada T, Ito T, Eishi Y. Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. *Microb Pathog*. 査読有. 46(2): 80-87, 2009.
- ② Ito T, Kobayashi D, Uchida K, Takemura T, Nagaoka S, Kobayashi I, Yokoyama T, Ishige I, Ishige Y, Ishida N, Furukawa A, Muraoka H, Ikeda S, Sekine M, Ando N, Suzuki Y, Yamada T, Suzuki T, Eishi Y. *Helicobacter pylori* invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. *Lab Invest*. 査読有. 88(6): 664-681, 2008.
- ③ Miyazaki E, Ando M, Fukami T, Nureki S, Eishi Y, Kumamoto T. Minocycline for the treatment of sarcoidosis: is the mechanism of action immunomodulating or antimicrobial effect? *Clin Rheumatol* 査読有. 27(9):1195-7,2008.
- ④ 磯部全, 須賀達夫, 青木康弘, 青木史暁, 池田香菜, 上野学, 前野敏孝, 倉林正彦, 江石義信. 胸部 CT でわずかにスリガラス陰影を認めたのみで、低酸素血症を呈したサルコイドーシスの 1 例. *日本呼吸器学会雑誌* 査読有. 46: 899-903, 2008.
- ⑤ Arai T, Inoue Y, Eishi Y, Yamamoto S, Sakatani M. *Propionibacterium acnes* in granulomas of a patient with necrotizing sarcoid granulomatosis. 査読有. *Thorax*. 63(1): 90-91, 2008.
- ⑥ Otsuka K, Terasaki F, Eishi Y, Shimomura H, Ogura Y, Horii T, Isomura T, Suma H, Kitaura Y. Cardiac sarcoidosis underlies idiopathic dilated cardiomyopathy: importance of mediastinal lymphadenopathy in differential diagnosis. *Circ J*. 査読有. 71:1937-41, 2007.
- ⑦ 在間未佳, 山口哲生, 田中健介, 漆山博和, 富樫佑基, 成田裕介, 山田嘉仁, 米満勤, 藁谷正明, 丹野正隆, 江石義信. 脊髄内視鏡にて組織診断し、PAB 抗体染色が陽性であった神経サルコイドーシスの 1 例. *サルコイドーシス/肉芽腫性疾患* 査読有. 27:86-87, 2007.
- ⑧ Ohta K, Yokoyama T, Abe T, Kurakawa E, Park J, Izumi M, Eishi Y, Ohyashiki K, Setoguchi Y. Identification of *propionibacterium acnes* in a case with

stage III pulmonary sarcoidosis involving hepatosplenic disease. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 査読有 44:625-630, 2006.

- ⑨ Tanabe T, Ishige I, Suzuki Y, Aita Y, Furukawa A, Ishige Y, Uchida K, Suzuki T, Takemura T, Ikushima S, Oritsu M, Yokoyama T, Fujimoto Y, Fukase K, Inohara N, Nunez G, Eishi Y. Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. *Biochim Biophys Acta*. 査読有. 1762(9): 794-801, 2006.
- ⑩ 太田香織, 横山智央, 阿部哲也, 庫川恵理, 朴辰浩, 泉美貴, 江石義信, 大屋敷一馬, 瀬戸口靖弘. 肉芽腫内に *P.acnes* 菌体成分を認め、肝臓・脾臓病変を伴った肺野型サルコイドーシス. *日本呼吸器学会雑誌*. 査読有. 44:625-630, 2006.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 内田佳介. 心サルコイドーシス病変組織における *P. acnes* 免疫染色. 「心サルコイドーシスの病態診断と治療に関する研究」第 3 回班会議. 2008 年 12 月 20 日. 於武田薬品工業株式会社名古屋支店会議室.
- ② 古川あすか. サルコイドーシス発症機構におけるアクネ菌細胞内感染とオートファジーの役割. 第 28 回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会. 2008 年 11 月 7 日. 於仙台国際センター.
- ③ Furusawa H. Quantitative Analysis of IL-2 mRNA Response to *P. acnes* and *M. tuberculosis*. *ATS*. May, 2008. Tronto, Canada.
- ④ 江石義信. 肉芽腫性疾患の新たな概念サルコイドーシス 内因性感染症の新たな疾病発生機構. 第 97 回日本病理学会総会. 2008 年 5 月 16 日. 於石川県立音楽堂.
- ⑤ 田邊剛. 自然免疫因子 NOD1 の機能低下によるサルコイドーシスの発症. 第 78 回日本衛生学会総会. 2008 年 3 月. 於熊本.
- ⑥ 内田佳介. サルコイドーシス患者における *P. acnes* 陽性肺胞マクロファージの増殖現象に関する研究. 第 96 回日本病理学会総会. 2008 年 3 月 15 日. 於グランキューブ大阪.
- ⑦ 古川あすか. サルコイドーシス患者アクネ菌分離株の細胞内侵入能を規定する遺伝子の解析. 第 96 回日本病理学会総会. 2008 年 3 月 15 日. 於グランキューブ大阪.
- ⑧ Eishi Y. Etiological aspects of sarcoidosis. 4th International WASOG Conference on Diffuse Lung Diseases. 2007. Tokyo.

- ⑨ 鈴木好美. サルコイドーシス疾病素因としてのNOD1 遺伝子多型解析及びその機能に関する検討. 第 26 回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会. 2006 年 10 月 6 日. 於東京、こまばエミナース.
- ⑩ 内田佳介. 欧州サルコイドーシス患者検体における *P. acnes* の免疫組織学的検出率に関する検討. 第 26 回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会. 2006 年 10 月 6 日. 於東京、こまばエミナース.
- ⑪ 古川あすか. *P. acnes* 分離株の遺伝子型・表現形質とサルコイドーシス疾患特異性. 第 26 回日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会. 2006 年 10 月 6 日. 於東京、こまばエミナース.
- ⑫ 江石義信. 「今後注目される感染症」サルコイドーシスと *Propionibacterium acnes*. 第 54 回日本化学療法学会総会. 2006 年 5 月 19 日. 於国立京都国際会館.
- ⑬ 鈴木好美. サルコイドーシス疾病素因としてのNOD1 遺伝子多型解析及びその機能に関する検討. 第 95 回日本病理学会総会. 2006 年 4 月 30 日. 於東京、京王プラザホテル.
- ⑭ 古川あすか. サルコイドーシス病変部分分離株 *P. acnes* の遺伝子多型と表現形質の解析. 第 95 回日本病理学会総会. 2006 年 4 月 30 日. 於東京、京王プラザホテル.
- ⑮ 江石義信. 「感染症学の Break-Through を目指して」感染・免疫・アレルギーの接点を求めて：呼吸器感染症を中心に、サルコイドーシスにおける *Propionibacterium acnes*. 第 80 回日本感染症学会学術講演会. 2006 年 4 月 21 日. 於ホテル日航東京.

[図書] (計 6 件)

- ① 江石義信. 克誠堂出版. 日本胸部臨床 第 67 巻増刊 「肺の病理診断 サルコイドーシスの病因的診断 呼吸器疾患の臨床検査 up to date」. 2008, 238-244.
- ② 江石義信. 日本結核病学会. 結核 第 83 巻 2 号 「肉芽腫性肺疾患と病原微生物 サルコイドーシスとアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*)」. 2008, 120-123.
- ③ 江石義信. 日本ビフィズス菌センター. 腸内細菌学雑誌 第 22 巻 2 号 「*Propionibacterium acnes* とサルコイドーシス：内因性感染症の新たな疾病発生機構」. 2008, 85-86.

- ⑯ 江石義信. 微生物と呼吸器疾患 宿主反応の多様性 サルコイドーシス 細胞壁欠失型アクネ菌の細胞内潜伏感染とその内因性活性化に伴う過敏性免疫反応. 呼吸器科 12:20-29. 2007.
- ⑰ 江石義信. 基礎医学から サルコイドーシスのアクネ菌病因説と新たな治療戦略. 日本医事新報 4317: 68-71. 2007.
- ⑱ 江石義信. 特集 肉芽腫性疾患をめぐる最近のトピックス、サルコイドーシスの病因をめぐる. 病理と臨床 24: 18-27. 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江石 義信 (EISHI YOSHINOBU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70151959

(2) 研究分担者

熊谷 二郎 (KUMAGAI JIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：80280973

小林 大輔 (KOBAYASHI DAISUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70361699

田邊 剛 (TANABE TUYOSHI)

島根大学・医学部・準教授
研究者番号：80260678

(3) 連携研究者

なし