

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08285

研究課題名(和文) ハンセン病の病態を反映するらい菌RNAマーカーの解析

研究課題名(英文) Exploration of *M. leprae* RNA markers reflecting the pathogenesis of leprosy

研究代表者

宮本 友司 (Miyamoto, Yuji)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官

研究者番号：40392328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハンセン病の薬剤治療効果判定を可能にするRNAマーカーの同定を目指し、薬剤で処理されたらい菌RNAの動態を把握するため、生体から抽出したらい菌及び生体内で増殖中のらい菌に対して網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、一部のらい菌遺伝子群が薬剤で処理された際に発現量を大きく変化させていることが判明した。さらに、これらの中には、発現量が比較的多いものも含まれていた。これらの結果は、変化の幅が大きくまたその変化を補足し易いという面において、らい菌遺伝子の中に生存度及び治療効果を的確に判定し得るマーカーの候補分子が存在する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハンセン病の治療には抗菌薬が使用されるが、それらの効果を的確に判定する手法は、現状確立されていない。本研究においては、ハンセン病の病原体であるらい菌の生存度を指標にした治療効果判定法の開発を目指し、らい菌の生存度と連動するRNAマーカーの同定を試みた。薬剤処理により変動するらい菌遺伝子の発現解析を実施した結果、生存度と連動する可能性のあるらい菌遺伝子をRNAマーカーの候補として同定した。これらの結果は、これまで困難であったハンセン病の治療効果判定法の開発に繋がる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Aiming to identify RNA markers that can be used to determine the efficacy of drug treatment for leprosy, we conducted a comprehensive gene expression analysis of *M. leprae* cells and those growing in vivo to understand the dynamics of *M. leprae* RNA when treated with drugs. As a result, it was found that the expression levels of some of the *M. leprae* genes were significantly altered also had relatively high expression levels. These results indicates that there may be candidate molecules among the *M. leprae* genes that can be used to accurately determine the viability and therapeutic efficacy of leprosy.

研究分野：細菌学

キーワード：ハンセン病 抗酸菌 らい菌 RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、結核と並び古代より人類の脅威となって来た抗酸菌感染症であり、現代においても未だ発展途上国を中心に年間 17 万人余りの新規患者が発生している。ハンセン病の病原体は、抗酸菌属に分類されるらい菌 (*Mycobacterium leprae*) であり、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) とは微生物学的に近縁に位置する。生体内に侵入したらい菌は長期間かけて皮膚組織内のマクロファージやシュワン細胞等に寄生し末梢神経障害を引き起こす。結果的に、この末梢神経障害は、外形的な変形や四肢の損傷等といったハンセン病特有の臨床症状である身体障害の主要因となる。多剤併用療法の導入により新規患者数はこの数十年で大きく減少したが、近年は下げ止まりの傾向にある。さらに、臨床症状を悪化させるらい反応などの病態を制御する重要性も、ハンセン病対策の柱として近年認識されつつある。しかし、多剤併用療法の効果が個々の患者でどれほど発揮されているのか、或いは、生じている病態がどのような状態であるか、といった点は経験的な臨床症状の観察に大きく依存している。従って、これらを正確に把握・制御する優れた手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

らい菌は、人工培地での増殖が不可能であるため、多剤併用療法等の薬剤治療の効果を判定する際には、培養試験などにより評価することは現状困難である。本研究では、治療効果と関連するらい菌の生存度に注目し、生存度と連動する RNA (遺伝子発現) の動態解析を通じて、らい菌の生存度、さらにはハンセン病の治療効果判定へと繋がる RNA マーカーの同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) らい菌をヌードマウスの足蹠内に接種後、半年以上経過した後に、足蹠かららい菌を抽出した。Rifampicin を含む抗酸菌培地にらい菌を懸濁し、一定時間 Rifampicin で処理した後に、total RNA を調製し RNA-seq によるらい菌遺伝子の網羅的発現解析を実施した。同時に、Rifampicin を含まない抗酸菌培地に懸濁したらい菌についても同様に解析を行った。

(2) らい菌を足蹠内に接種後、半年以上経過したヌードマウスに Rifampicin を含む水溶液を給水として一か月投与した。その後、足蹠よりらい菌を抽出し、調整した total RNA を使用して RNA-seq によるらい菌遺伝子の網羅的発現解析を実施した。また、Rifampicin を含まない水溶液を一か月投与したヌードマウスから抽出したらい菌においても、同様に解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヌードマウスの足蹠より抽出したらい菌について、Rifampicin で処理した場合、未処理に比べて、転写量の低下を示すらい菌遺伝子の割合が高い傾向を示した。その一方で、Rifampicin 処理下で逆に転写量が亢進したものも存在していた。それらは機能不明とされているものが高い割合で含まれていたが、機能が推定されるものの中には、らい菌の細胞壁構成成分の生合成に関わる複数の遺伝子が含まれていた。このことは、薬剤処理という大きな外的ストレスによって、らい菌自体が細胞壁構造を変化させている可能性を示唆するものである。さらに、生存度と細胞壁という菌体構造の変化との関連を解明する点において、意味のある結果であると考えられる。らい菌遺伝子の転写量に注目して解析を行った結果、元々の転写量が上位に位置する遺伝子群の中に Rifampicin 処理によりその転写量が著しく減少する遺伝子 (non-coding RNA を含む) が複数存在した。ハンセン病患者の皮膚組織中の微量のらい菌 RNA から生存度を評価する際には、qRT-PCR 等により評価する必要があるが、転写量自体が多く且つ薬剤によりそれらが大きく変化するものが含まれていたことは、

生存度と関連する RNA マーカーを基にした評価法を開発する上でこれらが有望な候補分子となり得る可能性を示している。また、機能について未解明な部分が多いらい菌における non-coding RNA の病態との関連性を解明する上でも、重要な意味を持つと考えられる。

(2) 足蹠内でらい菌が増殖中のヌードマウスに対して Rifampicin を投与し、その後抽出したらい菌の解析においては、複数のらい菌遺伝子群の発現量が Rifampicin 非投与群に比べて著しく変化していることが判明した。これらの中で、その発現が亢進した遺伝子群を解析すると、変化の度合いが高い遺伝子群の中に機能不明の偽遺伝子が多く含まれる傾向が観察された。一方、発現量が減少した遺伝子群の中には生命維持に不可欠な機能と関連する遺伝子群が偏在していた。このことは、らい菌に対して殺菌的な薬剤である Rifampicin が作用することにより、らい菌の生存度が低下したことが考えられる。

(1) 及び (2) の手法及び結果は、*in vitro* (動物から取り出したらい菌) 及び *in vivo* (動物内で増殖中のらい菌) の条件で解析を行ったものである。同定された遺伝子群の中には、(1) 及び (2) に共通するものもある一方、それぞれにのみ存在するものもあった。これらの結果は、薬剤が作用する濃度や機構による違いがあると考えられるが、*in vivo* 条件下である (2) の結果の方がよりハンセン病の薬剤治療に近い状況を反映していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本友司、前田百美、吉田光範、鈴木仁人、阿戸 学
2. 発表標題 Rifampicin 存在下におけるらい菌の遺伝子発現動態解析
3. 学会等名 第 94 回日本ハンセン病学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本友司、前田百美、阿戸 学
2. 発表標題 生体内におけるらい菌のRifampicinに対する反応解析
3. 学会等名 第 97 回日本ハンセン病学会総会・学術大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------