

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07552

研究課題名(和文) 結核肉芽腫の多様性、不均一性を組織透明化技術で明らかにする

研究課題名(英文) The variety and heterogeneity of tuberculous granuloma is revealed by tissue clearing technique

研究代表者

瀬戸 真太郎 (Shintaro, Seto)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部 免疫科・科長

研究者番号：50383203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌感染によって感染肺で肉芽腫が形成される。肉芽腫中における泡沫化マクロファージ(FM)は、結核菌増殖の場であり、乾酪壊死がFMから形成される。このことから、FMの特徴を明らかにすることは、結核制御において重要である。本研究では、結核菌感染C3HeB/FeJマウス感染肺を用いて、空間的マルチオミックスによってFMマーカーの同定を行った。4つのタンパク質および遺伝子がFM画分で共通して発現上昇していることが明らかになった。また、免疫染色によってこれらのマーカーがFMに局在していることを確認した。GSEA解析によって、FMではM2マクロファージとmTORC1シグナルの活性化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉芽腫中における泡沫化マクロファージ(FM)は、結核菌増殖の場であり、FMが壊死することによって乾酪壊死が形成される。このことから、FMの特徴を明らかにすることは結核制御において重要である。本研究で明らかにした結核肉芽腫でのFMにおける遺伝子発現様式によって、FMを標的にした宿主標的療法開発や結核発病進展予測マーカー開発への応用が期待できる。また、FM形成過程について新しい知見を提供するとともに、結核肉芽腫の病理生態学に対してさらなる理解を深めることができる。

研究成果の概要(英文)：Infection of Mycobacterium tuberculosis leads to the development of tuberculosis (TB) with the formation of granulomatous lesions. Foamy macrophages (FM) are the hallmark of TB granulomas, because they provide the primary platform of M. tuberculosis proliferation and the main source of caseum necrosis. In this study, we applied spatial multiomic profiling to identify the signatures of FM within the necrotic granulomas developed in C3HeB/FeJ mice. Four proteins and genes have been identified to be commonly enriched in FM region of necrotic granulomas. Immunohistochemistry confirmed the localization of identified signatures to FM of necrotic granulomas. Gene set enrichment analysis of transcriptomic profiling revealed the upregulation of genes related to M2 macrophage activation and mTORC1 signaling in FM.

研究分野：感染免疫

キーワード：結核菌 肉芽腫 泡沫化マクロファージ C3HeB/FeJ 空間的マルチオミックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核菌は細胞内寄生性細菌であり、個体に感染しても自然免疫では効率よく殺菌分解されず、適応免疫によって感染結核菌の封じ込めが行われる。すなわち、感染結核菌を中心にマクロファージが集積して、その外周をリンパ球で取り囲むことによって肉芽腫が形成される。結核肉芽腫では、リンパ球から産生される IFN- γ 、TNF- α などの炎症性サイトカインによってマクロファージが活性化されて、感染結核菌が殺菌される。また、殺菌から回避した結核菌はマクロファージの「障壁」に封じ込められてしまう。しかし、結核菌の増殖が阻害されずに炎症反応が持続すると、結核菌マクロファージは細胞内に脂質体を蓄積して、泡沫化マクロファージに分化する。泡沫化マクロファージは結核の進行に伴い、肉芽腫の形成、維持、感染伝播において中心的な役割を果たす。泡沫化マクロファージが壊死することによって、肉芽腫の中心で乾酪壊死が形成される。乾酪壊死に存在する結核菌は、抗菌物質や低酸素によって菌数を減少させて殺菌されるが、その一部は持続感染状態に移行すると考えられている。さらに炎症反応が持続すると、最終的には空洞が生じて排菌源になる。播種過程では、結核菌に感染した泡沫化マクロファージが元の肉芽腫から遊離して、その後、二次的な肉芽腫性病変が形成される。近年、結核菌感染マクロファージにおける詳細な特徴が解析されて、感染マクロファージ内での結核菌増殖に宿主脂質代謝が関与していることが示されている。さらに、mTORC1 シグナルを含むいくつかの細胞内シグナル伝達経路が、結核菌感染マクロファージにおける脂質体形成を制御している。しかし、肉芽腫内の泡沫化マクロファージにおけるタンパク質および遺伝子発現様式については十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、乾酪壊死を伴う肉芽腫における泡沫化マクロファージの特徴を明らかにするため、結核菌感染によって乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する C3HeB/FeJ マウスの感染肺を用いて、および空間的マルチオミックスを行った。泡沫化マクロファージを含む画分の特徴的遺伝子として、M2 マクロファージのマーカー遺伝子が存在していたため、M1 マクロファージに対するマーカー遺伝子の局在も明らかにした。遺伝子発現様式の解析によって、泡沫化マクロファージ層では M2 マクロファージの活性化と mTORC1 シグナルが活性化されていることを明らかにした。

3. 研究の方法

1. C3HeB/FeJ マウスに結核菌を感染させて、感染肺の組織透明化を行った。免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で組織透明化の評価を行った。
2. C3HeB/FeJ マウス感染肺切片を用いて、レーザーマイクロダイセクション法によって、乾酪壊死、泡沫化マクロファージ層、細胞層の3層に分画した。
2. それぞれの画分からタンパク質もしくは RNA を抽出して、プロテオミクス、トランスクリプトミックスを行った。
3. プロテオミクス、トランスクリプトミックスで共通して泡沫化マクロファージ層で共通して蓄積しているタンパク質の局在を免疫染色法によって明らかにした。
4. Gene set enrichment analysis (GSEA) によって、泡沫化マクロファージ層を特徴づける遺伝子発現様式を明らかにした。

4. 研究成果

1. 組織透明化技術による結核菌感染肺の観察

DsRed 発現結核菌をマウスに感染させて、感染肺を固定したのちに、組織透明化を行った。免疫染色はマクロファージ、もしくは好中球を染色することを明らかにしている抗体を直接蛍光物質でラベルして行った。蛍光顕微鏡で観察した結果、感染肺での結核菌およびマクロファージ、好中球を可視化することができた。脂質が非常に多く含まれる感染肺のため、脱脂工程を充分に行うことによって感染結核菌、および染色した細胞を蛍光顕微鏡で非常に明確に観察できた。

2. 泡沫化マクロファージマーカー遺伝子の探索

結核肉芽腫における新しいマーカー探索のために、泡沫化マクロファージに特異的に発現している遺伝子に注目した。結核菌感染 C3HeB/FeJ マウスの感染肺組織を用いて、肉芽腫をレーザーマイクロダイセクション法によって乾酪壊死、泡沫化マクロファージ層、その外周の細胞層に分画した。それぞれの画分のプロテオミクス、トランスクリプトミックスを行い、泡沫化マクロファージ層で共通して発現が増加しているタンパク質・遺伝子を同定した。その結果、4 遺伝子 (PLIN2、ARG1、MSR1、LGALS3) を同定することができた。同定したタンパク質は、免疫染色の結果、泡沫化マクロファージ層に局在していることが明らかになった (図 1)。PLIN2 はこれまでの報告で、アテローム性動脈硬化における泡沫細胞やヒト結核病理標本組織における泡沫化マクロファージで特異的に発現している遺伝子であることが明らかになっている。このことから、PLIN2 陽性細胞を泡沫化マクロファージとして、他マーカーとの共同在を明らかにした。MSR1、LGALS3 は PLIN2 陽性細胞に局在していたことから、これらの遺伝子は泡沫化マクロファージマーカーであるこ

とを示唆する。また、ARG1 は泡沫化マクロファージと共局在している細胞と共局在していない細胞が存在していた。M2 マクロファージのマーカ遺伝子である MSR1、ARG1 が泡沫化マクロファージに局在していたため、M1 マクロファージマーカである iNOS、CD68 の局在も明らかにした(図1)。その結果、両 M1 マクロファージマーカは泡沫マクロファージ層および細胞層に局在していた。また、PLIN2 との共局在解析の結果、両マーカが泡沫化マクロファージ共局在している細胞と、共局在していない細胞が存在した。以上の結果は、M1、M2 マクロファージが泡沫化マクロファージ層に移動していること、M1、M2 マクロファージマーカが局在している泡沫化マクロファージが存在することを示唆する。

泡沫化マクロファージ層における特異的な遺伝子発現様式を GSEA によって明らかにした。その結果、泡沫化マクロファージ層では、M2 マクロファージの活性化に関する遺伝子発現が増加していること、細胞増殖に関わる mTORC1 信号に関する遺伝子発現が増加していることが明らかになった。本研究で明らかにした結核肉芽腫での泡沫化マクロファージにおける遺伝子発現様式によって、泡沫化マクロファージを標的にした宿主標的療法開発や結核発病進展予測マーカ開発への応用が期待できる。

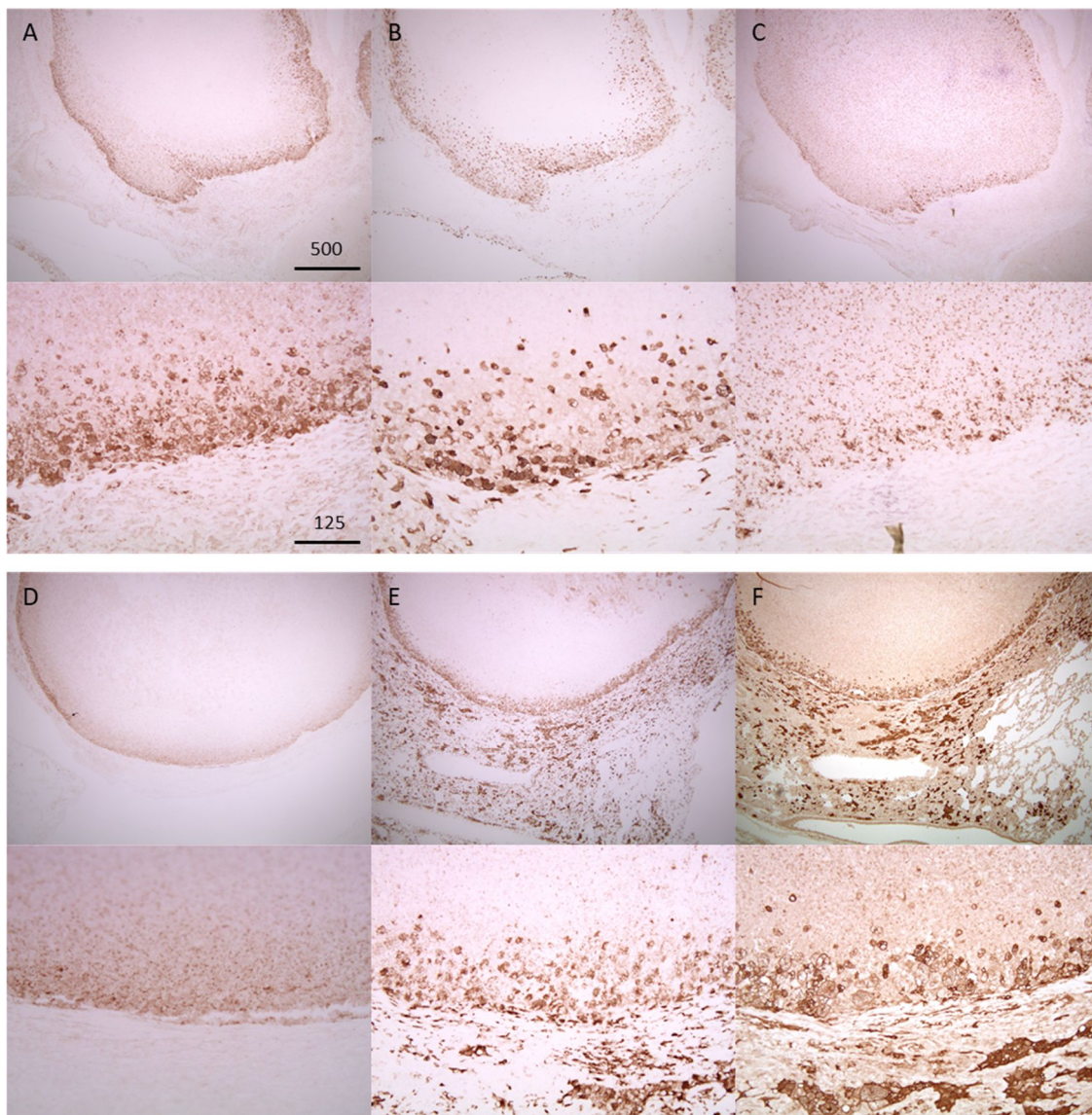


図1 泡沫化マクロファージマーカの局在

(A) PLIN2、(B) ARG1、(C) MSR1、(D) LGALS3、(E) iNOS、(F) CD68 の結核菌感染 C3HeB/FeJ マウス肺における乾酪壊死を伴う肉芽腫への局在を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shintaro Seto 1, Kozo Morimoto 2, Tsutomu Yoshida 2, Miyako Hiramatsu 2, Minako Hijikata 1, Toshi Nagata 3, Fumihito Kikuchi 4, Yuji Shiraishi 2, Atsuyuki Kurashima 2, Naoto Keicho 5	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomic Profiling Reveals the Architecture of Granulomatous Lesions Caused by Tuberculosis and Mycobacterium avium Complex Lung Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 3081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.03081	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 Koji Furuuchi 1 2 3, Shintaro Seto 1, Hajime Nakamura 1, Haruka Hikichi 1, Akiko Miyabayashi 1, Keiko Wakabayashi 1, Kazue Mizuno 4, Teruaki Oka 5, Kozo Morimoto 3, Minako Hijikata 1, Naoto Keicho 2 6	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Screening System of Virulent Strains for the Establishment of a Mycobacterium avium Complex Lung Disease Mouse Model Using Whole-Genome Sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Spect	6. 最初と最後の頁 e0045122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00451-22	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬戸真太郎, Tz-Chun Guo, 土方美奈子, 慶長 直人
2. 発表標題 マルチオミックス解析で明らかにするマウス結核肉芽腫の分子構造
3. 学会等名 95回結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------