

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16260

研究課題名（和文）ゲノム編集マウスで明らかにする乾酪壊死を伴う結核肉芽腫の形成機構

研究課題名（英文）Mechanism of Tuberculosis Granuloma Formation with Caseous Necrosis Revealed in Genome-Edited Mice.

研究代表者

中村 創（Nakamura, Hajime）

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部・研究員

研究者番号：70764314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：C3HeB/FeJマウスに結核菌を感染させると乾酪壊死を伴う肉芽腫が形成されるが、この現象にはSp140遺伝子の発現低下が関与している。本研究では、結核菌感染ヒトマクロファージにおけるSP140遺伝子の機能を明らかにした。SP140遺伝子発現をノックダウンしたマクロファージは結核菌感染に対して抵抗性を示した。また、RNAシーケンシングの結果、I型およびII型インターフェロン応答遺伝子群の発現が減少していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核において乾酪壊死を伴う肉芽腫（壊死性肉芽腫）は、抗結核薬の浸透性の低さなどの点からも結核制御における重要な要因であり、その形成機構を解明することが強く望まれている。本研究で明らかにした、SP110、SP140遺伝子ノックダウンマクロファージにおける遺伝子発現パターンの解析を進めることで、壊死性肉芽腫の形成機構を解明するための一助となる。

研究成果の概要（英文）：The Super susceptible tuberculosis 1 (Sst1) locus, including SP110 and SP140 gene, is associated with the formation of tuberculosis (TB) granuloma with caseous necrosis in Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) -infected C3HeB/FeJ mice. However, the function of the SP110 and SP140 genes in human TB is not yet understood. In this study, we analyzed the function of SP110 and SP140 genes in M. tuberculosis-infected human macrophages. The resistance to M. tuberculosis was activated in the SP140 gene knockdown macrophages. In RNA sequencing, the type I/II IFN associated gene expression were downregulated in the SP140 gene knockdown macrophages.

研究分野：感染免疫

キーワード：結核菌 マクロファージ 肉芽腫 SP110 SP140

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

ヒト結核では、乾酪壊死を伴う結核肉芽腫（壊死性肉芽腫）が形成される。乾酪壊死は、結核肉芽腫内の中心部の泡沫化したマクロファージが壊死することで形成されと考えられている。乾酪壊死を中心にその周辺にマクロファージやリンパ球が集積する。乾酪壊死中の結核菌は抗菌物質や低酸素により菌の増殖が抑制され殺菌されるが、一部の結核菌は持続感染を維持する。乾酪壊死での炎症状態が継続した場合、肉芽腫内に空洞が形成され排菌源となる。

結核研究に一般的に用いられる C57BL/6 マウスや BALB/c マウスは結核菌感染に対して抵抗性であり、感染肺に壊死性肉芽腫は形成されない。一方で、C3HeB/FeJ マウスは結核菌感染に対して感受性を示し、ヒトと同様に壊死性肉芽腫が形成されることが知られている。これらの原因遺伝子は *Sst1* (super-susceptibility to tuberculosis 1) 遺伝子座が関与していることが明らかになっている (Pan. *et al.*, 2005, Nature)。*Sst1* 遺伝子座に存在する *SP110*、*SP140* の両遺伝子はヒトとマウスの両方に存在するが、オルソログ間の同一性は約 50%であり、マウスとヒトの両方向からの研究によって機能解析を行うことが必要である。結核菌感染に対して抵抗性を示す C57BL/6 マウスをベースに *Sp140* 遺伝子を欠損させたマウスでは結核菌感受性になり、*Sp140* 遺伝子と I 型インターフェロン受容体遺伝子を同時に欠損させたマウスでは結核菌抵抗性をそれぞれ示すことが報告されている (Ji DX. *et al.*, 2021, eLife)。また、ヒトにおいては、*SP110* 遺伝子が NF- κ B 活性を調節することによって感染宿主の防御免疫機構を補助していることが明らかになっている (Leu. *et al.*, 2017, AJRCCM)。しかし、*SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子の結核免疫における機能の詳細や壊死性肉芽腫の形成機構との関連性について、詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*SP110*、*SP140* 遺伝子の標的因子を同定することによって、壊死性肉芽腫形成において機能する遺伝子群の詳細を明らかにすることである。マウスを用いた研究では、マウスの体外に受精卵を取り出すことなく、妊娠メスマウスの卵管を介して中にある受精卵のゲノムを編集し、特定の遺伝子が改変されたマウスを作製する手法である GONAD 法を用いて *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスの作製を試みた。また、ヒト結核における *SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子の機能を明らかにするために、ヒト THP-1 細胞を用いて結核菌感染マクロファージにおける両遺伝子の機能解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) GONAD 法を用いて *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子 KO マウスの作製を試みた。
- (2) C3HeB/FeJ マウスおよび C3H/HeN マウスから骨髓由来マクロファージ (BMDM) を調製し、結核菌を感染させた。結核菌感染マクロファージから RNA を抽出し、RNA シークエンシングを行ってマウスマクロファージにおける遺伝子発現パターンを解析した。
- (3) ヒト THP-1 細胞を用いて、*SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子に対する siRNA で各遺伝子のノックダウン (KD) 細胞を作製し、結核菌を感染させた。各遺伝子 KD 細胞から回収したサンプルを用いて、細胞内の結核菌数を CFU アッセイで測定した。また、real time PCR、RNA シークエンシングを行って各遺伝子 KD 細胞の遺伝子発現パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) GONAD 法を用いた *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子 KO マウスの作製

浜松医科大学高林准教授との共同研究により、GONAD 法による *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子 KO マウスの作製を試みた。*Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子それぞれに特異的な配列を選出し、ガイド RNA の設計を行った。設計したガイド RNA を用いた GONAD 法により、C3H/He マウスをベースに *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子 KO マウスの作製を試みたが、標的遺伝子を KO できなかった。マウスにおいて *Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子には類似配列が多数存在するため、標的遺伝子のみに対応した特異的なガイド RNA を設計することが困難であった。また、すでに報告されている CRISPR-Cas9 による *Sp140* 遺伝子 KO マウス作成に使用されたガイド RNA を用いても GONAD 法では KO マウスは作製できなかった。

(2) C3HeB/FeJ マウスマクロファージにおける遺伝子発現解析

C3HeB/FeJ マウスと C3H/HeN マウスから BMDM を調製し、結核菌強毒株 Erdman を感染させた。感染 24 時間後に細胞から RNA 抽出し、RNA シーケンシングによって得られたデータを用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。結核菌感染 C3HeB/FeJ マウスマクロファージにおける HALLMARKS 遺伝子発現パターンでは、I 型、II 型インターフェロン応答遺伝子群などの炎症に関わる遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなった (図 1)。

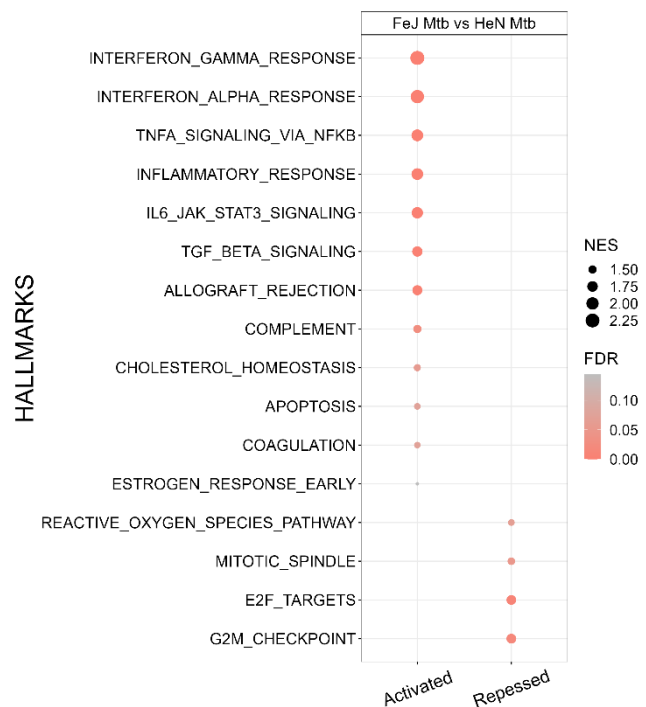


図 1 結核菌感染マウスマクロファージの遺伝子発現

(3) *SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子 KD ヒト THP-1 細胞における機能解析

ヒト THP-1 細胞の *SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子を siRNA によって KD した。各遺伝子 KD 細胞に結核菌標準株 H37 Rv を感染し、24 時間後と 48 時間後に細胞内生菌数を CFU アッセイにより測定した。24 時間後、48 時間後共にコントロール細胞と各遺伝子 KD 細胞の間で有意な差は認められ

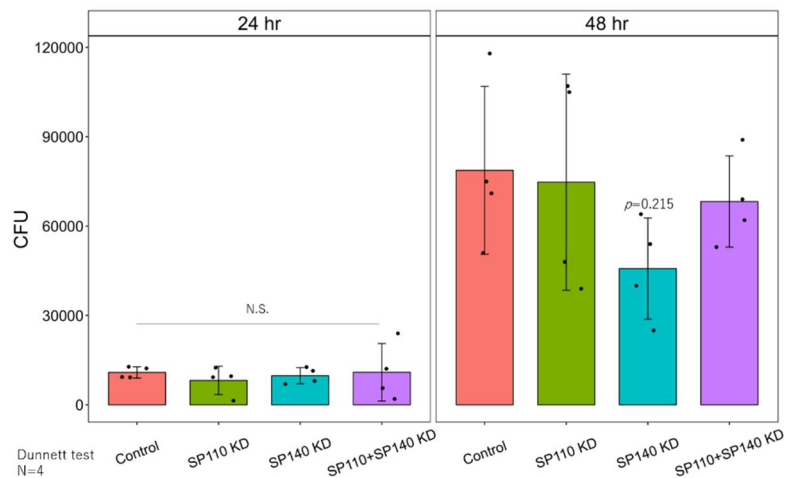


図 2 ヒト THP-1 細胞における結核菌 CFU の経時的変化

なかったが、感染 48 時間後の *SP140* 遺伝子 KD 細胞において、細胞内 CFU の増加が抑制される傾向が観察された(図 2)。また、この結果が *SP140* 遺伝子 KD による生細胞の割合の減少に起因していないかを死細胞蛍光試薬を用いて確認した。その結果、*SP140* 遺伝子 KD 細胞の生細胞の割合に有意な減少は認められなかった(図 3)。

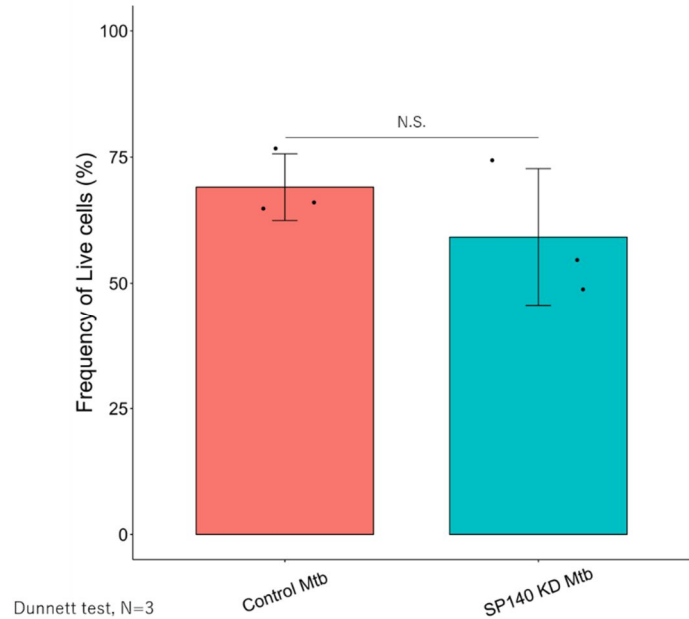


図 3 *SP140* 遺伝子 KD 細胞の生存率

次に、結核菌感染 24 時間後の *SP110* 遺伝子、*SP140* 遺伝子 KD 細胞から抽出した RNA を用いて RNA シークエンシングを行った。RNA シークエンシングによって得られたデータを用いて GSEA を行った。コントロール細胞における結核菌感染群と非感染群を比較した結果、HALLMARKS 遺伝子発現パターンでは、I 型、II 型インターフェロン応答遺伝子群や TNF- α シグナリングに關与する遺伝子群の発現が上昇した。各遺伝子 KD 細胞においても、結核菌感染によって、同様の発現パターンを示した(図 4)。

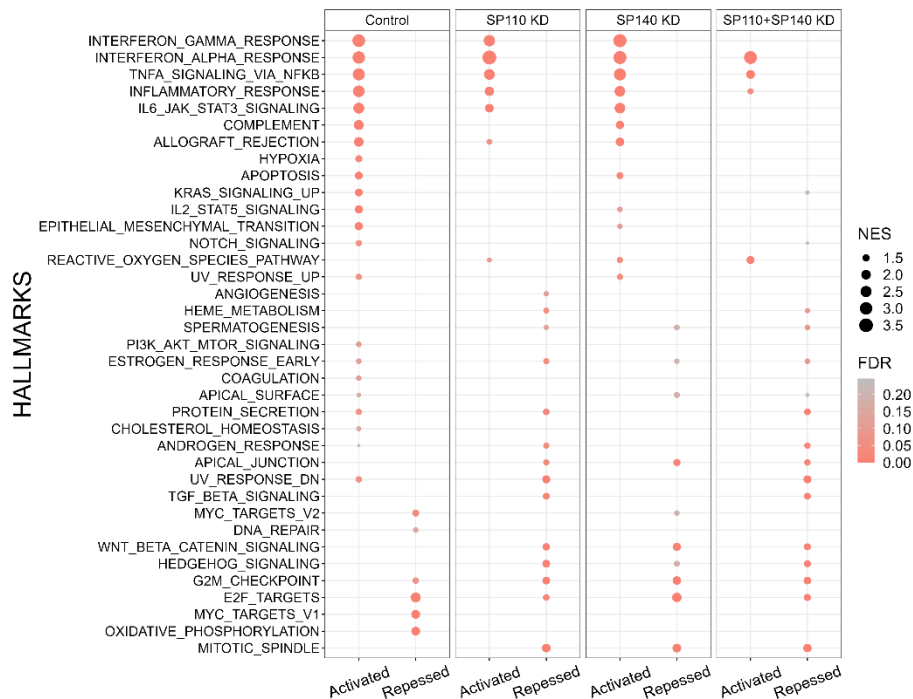


図 4 結核菌感染群と非感染群における遺伝子発現

一方、結核菌感染 KD 細胞と結核菌感染 Control 細胞を比較したところ、各遺伝子 KD 細胞では I 型、II 型インターフェロン応答遺伝子群の発現が低下することが確認された(図 5)。また、*SP140* 遺伝子 KD 細胞において、TNF- α シグナリングに關与する遺伝子群の発現が上昇することが確認された(図 5)。

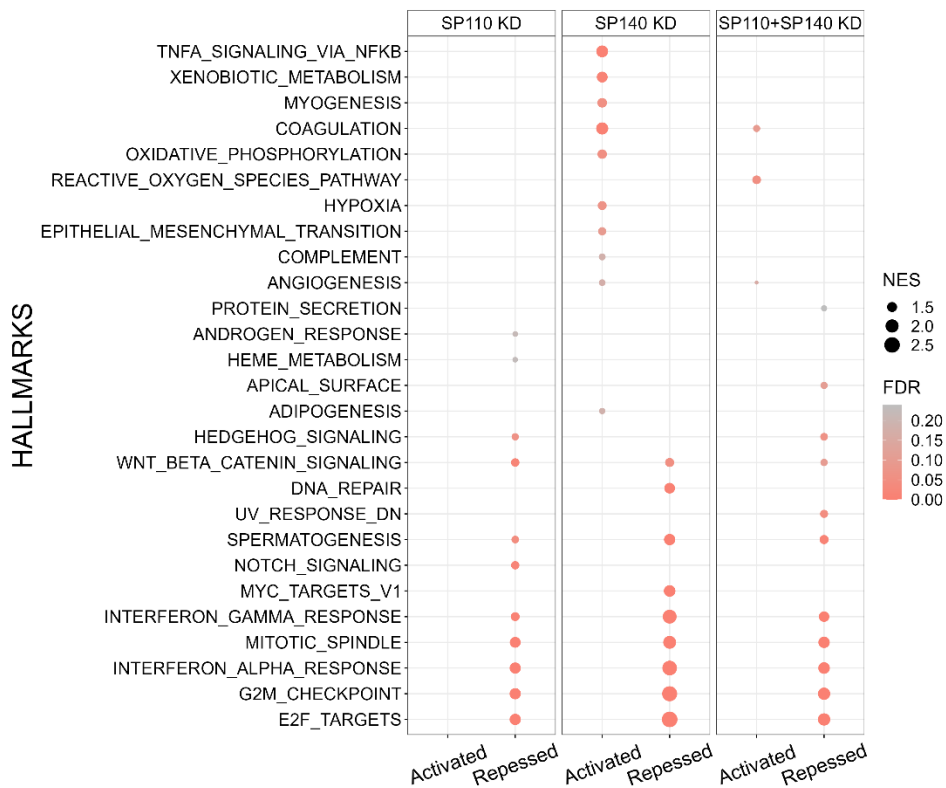


図 5 結核菌感染各遺伝子 KD 細胞の遺伝子発現

I 型または II 型インターフェロンによって誘導されるサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量を real time PCR によって調べた。MX1 や IFIT2 遺伝子は、各遺伝子 KD 細胞において有意な発現の減少が観察された。特に、*SP140* 遺伝子 KD 細胞における発現減少が顕著であった (図 6)。

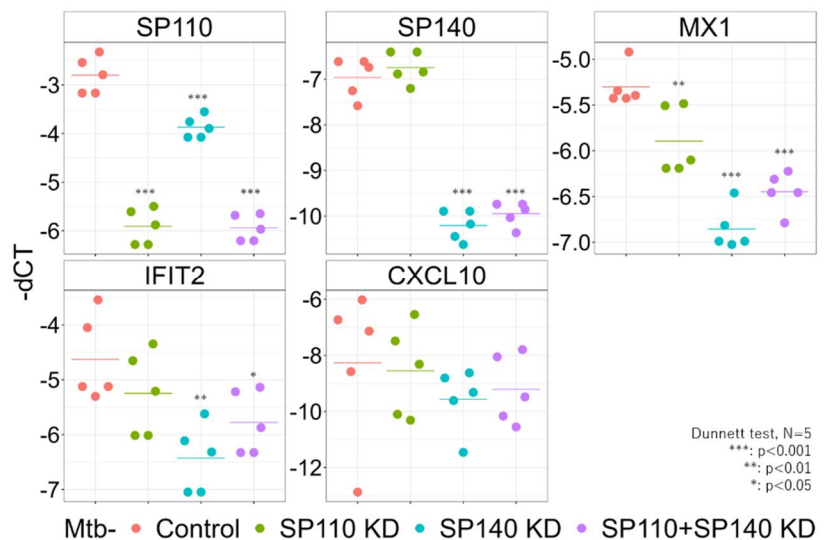


図 6 real time PCR による mRNA 発現量の測定

本研究で明らかにした結果から、C3HeB/FeJ マウスのマクロファージにおいては、*Sp110* 遺伝子、*Sp140* 遺伝子の発現低下によって I 型、II 型インターフェロン応答遺伝子群の発現上昇が誘導され、結核菌感染に対して感受性を示す可能性が示唆された。一方で、ヒトマクロファージにおいては *SP140* 遺伝子の KD によって、I 型、II 型インターフェロン応答の発現低下や TNA- α シグナリングの発現上昇が生じ、結核菌感染細胞内での結核菌制御のバランスが崩れて抗結核菌活性が亢進することが示唆された。以上のことから、*SP140* 遺伝子のヒトにおける機能とマウスにおける機能では逆転が生じていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村創
2. 発表標題 ヒト結核モデルマウスを用いた潜在感染モデルの構築
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村創
2. 発表標題 結核菌感染ヒトマクロファージ細胞におけるSP110、SP140遺伝子のRNAシーケンシングによる機能解析
3. 学会等名 第97回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村創
2. 発表標題 結核菌感染ヒトマクロファージ細胞における転写因子SP110、SP140遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第98回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村創
2. 発表標題 結核菌感染マクロファージにおける結核感受性にかかわる転写因子SP110、SP140遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第6回抗酸菌研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------