

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17471

研究課題名（和文）抗酸菌によるマクロファージの抗原提示抑制に関わるCerS2の役割

研究課題名（英文）Role of CERS2 in suppressing antigen presentation mechanism by mycobacteria in macrophages.

研究代表者

花房 慶（Hanafusa, Kei）

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：40867909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：病原性抗酸菌は宿主免疫機構の回避により細胞内寄生をし、抗原提示細胞に感染すると抗原提示を抑制する。本研究では、抗酸菌を貪食したマクロファージにおいてスフィンゴ脂質とその代謝網に着目して抗原提示機構を調べた。セラミド合成酵素の遺伝子発現を操作したマクロファージのモデル細胞では抗酸菌の殺菌が減弱することから、抗原提示機構の活性化にはスフィンゴ脂質の分子種が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非結核性抗酸菌感染症（NTM症）は日本において増加している細菌性感染症である。NTM症に対する有効な治療薬の開発は急務であり、多剤耐性菌が出現しないような新たな作用機序が求められている。本研究では、抗原提示細胞であるマクロファージが生合成するスフィンゴ脂質と抗原提示機構における殺菌について調べた。その結果、抗酸菌の殺菌にスフィンゴ脂質が関与することを見出した。この成果は多剤耐性を誘導しない新たな治療薬開発の糸口となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Vilulenet mycobacteria are characterized by intracellular parasitism by evasion of host immune mechanisms and suppress antigen presentation in antigen-presenting cells. In this study, the mechanism of antigen presentation in mycobacteria-phagocytosed macrophages was focused on sphingolipids and their metabolic network. The attenuated bactericidal activity of mycobacteria in the model of human macrophage in which gene expression of ceramide synthase was manipulated, indicating that the molecular species of sphingolipids are important for the activation of the antigen-presenting mechanism.

研究分野：脂質生化学、感染免疫学

キーワード：スフィンゴ脂質 抗酸菌 マクロファージ 抗原提示 食胞成熟

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

結核は世界中で最も多い細菌性感染症であり、感染者数は4人に1人と推定されている。治療には抗生物質を複数組み合わせた多剤療法が用いられ、現在ではその耐性菌が出現したことにより再興感染症とされている。一方で、日本においては非結核性抗酸菌感染症 (NTM 症) が急増しており、2014 年においては世界で最も感染者数が多いことが報告されている (Namkoong et al., *Emerg Infect Dis.* 2016)。NTM 症の主な症例は *Mycobacterium avium* complex (MAC) が病原菌である肺 MAC 症とされている。結核の原因菌である結核菌 (MTB) や MAC に代表される病原性抗酸菌は宿主の免疫機構を回避し、細胞内寄生する特徴を持つため、結核や NTM 感染症に罹患すると生体内に存在する病原菌を排除することが困難であり、再発リスクが高い。

このような微生物が生体内に侵入すると、抗原提示細胞であるマクロファージは生体内に侵入した微生物を貪食して排除する。微生物を貪食したマクロファージの細胞内では、微生物を内包した食胞が形成する。食胞にはエンドソームやリソソームのような細胞内小器官が融合することで食胞成熟が進み、内包した微生物を消化する。殺菌に伴って生じる消化断片は抗原提示に必須な分子である MHC クラス II に積載して細胞表面に発現させることで、T 細胞に抗原提示を行う。抗原提示は適応免疫を誘導するほか、T 細胞を活性化することで IFN- $\gamma$  のようなサイトカインが産生されるようになり、抗原提示細胞がさらに活性化されて殺菌が促進される。

これまでに申請者らの研究グループは自然免疫の最前線で活躍する好中球に着目して研究を行ってきた。ヒト好中球にはスフィンゴ糖脂質の一つであるラクトシルセラミド (LacCer) が豊富に発現しており、細胞表面に発現した炭素鎖数が 22 以上である極長鎖脂肪酸鎖を持つ LacCer が病原性抗酸菌の細胞壁成分であるリポアラビノマンナン (LAM) を認識することによって、貪食能が活性化される (Nakayama et al., *Sci Signal.* 2016)。通常、ヒト好中球の食胞においては LacCer のマイクロドメインにシグナル伝達分子である HcK が局在することでリソソーム融合が促進されるが、LAM はその HcK の局在を阻害してリソソーム融合を抑制することがわかった。以上のことから、ヒト好中球において極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質が貪食や殺菌に関わることが明らかとなり、そのスフィンゴ脂質を利用して病原性抗酸菌は宿主の免疫機構を回避していることがわかってきた。また、マウスマクロファージにおいては、シリカビーズを貪食させると食胞のセラミドの生合成量が増加してセラミド合成酵素 (CERS) の局在も食胞成熟に伴って変化することが報告されている (Pathak et al., *ACS Chem Biol.* 2018) ことから、マクロファージの食胞成熟にもスフィンゴ脂質が関与していると考えられる。しかしながら、抗原提示細胞における抗酸菌の殺菌に伴った抗原提示機構に関するスフィンゴ脂質の役割は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、抗原提示細胞における抗原提示機構と極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質やその代謝産物との関係性や、抗酸菌が抑制する抗原提示機構を調べることにより、病原性抗酸菌がどのように宿主の免疫機構を回避しているかを明らかにする。また、これらの仕組みを理解することで、宿主の免疫機構を利用した多剤耐性を誘導しないような NTM 症の治療薬開発のシーズの糸口を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

先行研究より、ヒト好中球において極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質を利用した病原性抗酸菌による宿主の免疫機構を回避する仕組みが存在すると考えられるが、抗原提示細胞における仕組みは不明である。そのため、ヒトマクロファージモデルとして使用されるヒト単球性急性白血病細胞株 THP-1 細胞について、極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質を生合成する酵素であるセラミド合成酵素 2 (CERS2) を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集法によりノックアウトした (CERS2KO)。さらに、CERS2KO に CERS2 を発現させたレスキュー株 (CERS2Res) も作製した。これらの細胞をホルボールエステルである PMA によりマクロファージ系に分化させて (PMA-THP-1)、本研究に使用した。また、健康者ボランティアより採血して末梢血から単球を分離し、リコンビナント M-CSF 存在下で培養することにより、ヒト末梢血単球由来マクロファージを作製して実験に供した。

#### (1) 抗酸菌に対する貪食能の検討

非病原性抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* (MSMEG) や病原性抗酸菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) を Alexa Fluor 488 (AF488) Protein labeling kit により蛍光標識して PMA-THP-1 に貪食させた。これらの細胞を CellMask および LysoTracker により染色してパラホルムアルデヒドによる固定後、共焦点顕微鏡により観察した。得られた画像から Phagocytic Index を算出して評価した。

#### (2) 貪食した抗酸菌に対する殺菌能の検討

MSMEG や MAC を貪食させた PMA-THP-1 細胞を可溶化して寒天培地上に播種し、CFU assay

を行った。

### (3) 抗酸菌を内包した食胞へのリソソーム融合に関する検討

AF633 でラベルした MSMEG や MAC を貪食させた PMA-THP-1 細胞をリソソームマーカーである LAMP1 を抗 LAMP1 抗体により免疫染色して、共焦点顕微鏡により観察した。得られた画像は食胞における LAMP1 の局在率を算出して評価した。

## 4. 研究成果

まずはじめに、マクロファージのモデル細胞である PMA-THP-1 とヒト末梢血単球由来マクロファージ (MDMs) のセラミド合成酵素発現パターンをリアルタイム PCR(qPCR) により解析した結果、哺乳類に発現するセラミド合成酵素 1~6 は MDMs と似た発現パターンを示すことを確認した。また、野生株 (WT) や Cas9 を発現させたコントロール株 (Cas9)、CERS2KO、CERS2Res において、qPCR により遺伝子発現が十分に認められた CERS2、CERS4、CERS5、CERS6 のタンパク質の発現量をウエスタンブロッティング法により比較した。その結果、CERS2 以外には有意な差が得られないことがわかった。次に、実際に生合成されるスフィンゴ脂質分子種について高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) 法による脂質分析を行なったところ、CERS2KO では極長鎖脂肪酸鎖が含まれるバンドが検出感度以下であり、CERS2Res ではその発現が回復することを確認した。次に、ヒト好中球や PMA-THP-1、MDMs 間での脂質の発現パターンを比較した。HPTLC により分析した結果、ヒト好中球とマクロファージではスフィンゴ脂質の発現パターンが異なっており、マクロファージでは LacCer がほとんど検出できないことから、好中球とは異なる様式で殺菌が回避されていると考えられた。

これまでにヒトマクロファージ様細胞である U937 細胞において、CERS2 や脂肪酸伸長酵素である ELOVL1 をノックダウンさせると Zymosan の貪食能が減少することが報告されている (Haney et al., Nat Genet. 2018)。そのため、各 PMA-THP-1 細胞について MSMEG と MAC を貪食させて貪食能を調べた。その結果、これらの細胞間では MSMEG や MAC の貪食に有意な差が認められなかった。既報との違いとして使用している細胞株が異なることや、貪食対象を認識する受容体が異なることが挙げられ、MSMEG や MAC に対する貪食能については CERS2 の発現が関与しないと考えられた。

次に、貪食した抗酸菌の殺菌について CFU assay により細菌の生存率を調べた結果、貪食後 6 時間では CERS2KO の MSMEG の殺菌が減弱されていた、一方で、MAC の殺菌には差が認められなかった。貪食から 24 時間後では、CERS2KO の MSMEG の殺菌は減弱されたままである、一方で、CERS2Res の MAC の殺菌が減弱されていることがわかった。これらの結果から、MSMEG の殺菌には CERS2 の発現が重要な役割を担っているのに対して、MAC を貪食させた場合では CERS2 の過剰な発現が宿主の免疫機構回避を促進させるような役割があることが示唆された。

以上の結果から、殺菌を伴った抗原提示機構に CERS2 の発現が関与していることが考えられるため、実際に殺菌に重要とされるリソソーム融合について、リソソームマーカーである LAMP1 を免疫染色して調べた。MSMEG を貪食させてから 6 時間後における解析を行うと、殺菌が減弱されていた CERS2KO では LAMP1 の局在が WT と同程度であることがわかった。そのため、MSMEG の殺菌にはリソソーム融合以外の要因が重要であると考えられた。これらの結果から、宿主のスフィンゴ脂質の生合成もしくはその合成酵素の発現が、抗原提示機構の中でも殺菌について、リソソーム融合以外の要因に極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質が関与していると考えられた。しかしながら、本研究では他の脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質が抗原提示機構にどのように関与しているか、また、実際の抗原提示能との関連性については未だ不明である。今後は更なる分子メカニズムを調べるために食胞融合する因子を調べることや T 細胞を用いた抗原提示能の検定、さらにはマクロファージにおける抗原提示を抑制する抗酸菌由来の分子を同定することにより、治療薬開発の糸口を明確にする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakayama Hitoshi、Hanafusa Kei、Iwabuchi Kazuhisa	4. 巻 2613
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 in molecular biology	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 Iwabuchi Kazuhisa、Nakayama Hitoshi、Hanafusa Kei	4. 巻 39
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 Nakayama Hitoshi、Oshima Eriko、Hotta Tomomi、Hanafusa Kei、Nakamura Kota、Yokoyama Noriko、Ogawa Hideoki、Takamori Kenji、Iwabuchi Kazuhisa	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	6. 最初と最後の頁 102165 ~ 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 Yokoyama Noriko、Hanafusa Kei、Hotta Tomomi、Oshima Eriko、Iwabuchi Kazuhisa、Nakayama Hitoshi	4. 巻 22
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 ~ 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 Li Xiaojia, Hanafusa Kei, Kage Madoka, Yokoyama Noriko, Nakayama Hitoshi, Hotta Tomomi, Oshima Eriko, Kano Koki, Matsuo Ichiro, Nagatsuka Yasuko, Takamori Kenji, Ogawa Hideoki, Hirabayashi Yoshio, Iwabuchi Kazuhisa	4. 巻 569
2. 論文標題 Lysophosphatidylglucoside is a GPR55 -mediated chemotactic molecule for human monocytes and macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.090	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 Hanafusa Kei, Hotta Tomomi, Iwabuchi Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Glycolipids: Linchpins in the Organization and Function of Membrane Microdomains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.589799	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 Shimai Ryosuke, Hanafusa Kei, Nakayama Hitoshi, Oshima Eriko, Kato Masaki, Kano Koki, Matsuo Ichiro, Miyazaki Tetsuro, Tokano Takashi, Hirabayashi Yoshio, Iwabuchi Kazuhisa, Minamino Tohru	4. 巻 13
2. 論文標題 Lysophosphatidylglucoside/GPR55 signaling promotes foam cell formation in human M2c macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-39904-x	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 Nakayama Hitoshi, Hanafusa Kei, Yamaji Toshiyuki, Oshima Eriko, Hotta Tomomi, Takamori Kenji, Ogawa Hideoki, Iwabuchi Kazuhisa	4. 巻 143
2. 論文標題 Phylactic role of anti-lipoarabinomannan IgM directed against mannan core during mycobacterial infection in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tuberculosis	6. 最初と最後の頁 102391 ~ 102391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tube.2023.102391	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20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島井亮輔、花房慶、中山仁志、加藤雅紀、狩野航輝、松尾一郎、平林義雄、岩淵和久、宮崎哲郎、戸叶隆司、南野徹
2. 発表標題 リゾホスファチジルグルコシドはGPR55を介してマクロファージに作用しアテローム性動脈硬化症に関与する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花房慶、李曉佳、大嶋恵理子、堀田知美、伊藤拓夢、狩野航輝、松尾一郎、中山仁志、上口裕之、平林義雄、岩淵和久
2. 発表標題 リゾホスファチジルグルコシド / GPR55を基軸としたシグナルを介した好中球ホメオスタシスについて
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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よる抗酸菌の殺菌機構における極長鎖脂肪酸鎖を有するスフィンゴ脂質の役割について
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
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65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 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 日本化学会春季年会
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 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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田遥香、杉山寛崇、花房慶、渡邊真衣、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)分岐を有するマンナン誘導体の合成とその機能評価
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花房慶、李曉佳、堀田知美、大嶋恵理子、中山仁志、狩野航輝、松尾一郎、伊藤拓夢、上口裕之、平林義雄、岩淵和久
2. 発表標題 ホスファチジルグルコシドは好中球ホメオスタシスに関与する
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 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 花房慶、竹田浩章、菅原彩乃、柳田光昭、狩野航輝、松尾一郎、中嶋和紀、上口裕之、中山仁志、平林義雄、岩淵和久
2. 発表標題 nano-LC-MS/MSによる生理活性脂質リゾホスファチジルグルコシドの高感度定量分析法の開発
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021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 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 ヒトマクロファージの抗酸菌殺菌機構における極長鎖脂肪酸鎖を持つスフィンゴ脂質とその合成酵素の役割
3. 学会等名 第7回抗酸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山仁志、花房慶、大嶋恵理子、小畑謙太郎、山地俊之、岩淵和久
2. 発表標題 抗酸菌の食胞成熟におけるスフィンゴ脂質代謝の重要性について
3. 学会等名 第7回抗酸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山仁志、花房慶、小畑謙太郎、岩淵和久
2. 発表標題 食胞成熟におけるスフィンゴ脂質代謝とC1Pの重要性について
3. 学会等名 第16回セラミド研究会学術集会・第17回スフィンゴセラピー研究会合同年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山仁志、花房慶、山地俊之、大嶋恵理子、小畑謙太郎、岩淵和久
2. 発表標題 マクロファージへの抗酸菌感染における抗リポアラビノマンナンIgM抗体の防御的役割について
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花房慶、竹田浩章、洪慧馨、柳田光昭、梅津綾子、狩野航輝、松尾一郎、中山仁志、平林義雄、岩淵和久
2. 発表標題 飽和脂肪酸鎖で構成されるホスファチジルグルコシドの分子種の解析
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------