

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591253

研究課題名（和文）真皮内組織球におけるらい菌の寄生と排除の相互作用とハンセン病発症に関する研究

研究課題名（英文）Intracellular parasitization of *Mycobacterium leprae* and development of leprosy

研究代表者

石井 則久（NORIHISA ISHII）

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・センター長

研究者番号：50159670

研究成果の概要（和文）：

ハンセン病の起原菌であるらい菌は、宿主細胞であるマクロファージに感染した後に、ファゴゾームにライソゾームの融合を阻止する因子や脂質の蓄積や異化作用に重要な因子の発現や細胞内局在を変化させることによって、細胞内寄生に都合の良い環境を作っていることが明らかになった。そのような作用はらい菌の生菌だけが持っており、加熱死菌には無かった。また、ハンセン病の治療薬の 1 つであるクロファジミンは、らい菌が持つ上記作用を阻害した。

研究成果の概要（英文）：

Upon infection, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), a causative agent of leprosy, modulates expression and localization of host proteins necessary for inhibition of phagosome-lysosome fusion, and for lipid accumulation or catabolism to create cellular microenvironment that is favorable for its intracellular parasitization. Only live *M. leprae*, but not heat-killed *M. leprae* had such effects. One of the drugs used to treat leprosy, clofazimine, suppressed such effects of *M. leprae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,100,000	0	1,100,000
2012 年度	70,000	0	70,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ハンセン病・らい菌・細胞内寄生

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、未だ世界レベルでは年間 20 万人を越える新患が発症しており、皮膚科領域における重要な感染症の 1 つである。起原菌であるらい菌は、結核菌に先立って発見され、その後の長い研究の歴史があるにもかかわらず、未だ試験管内培養法が確立されていない為に、菌の病原性や発症機構などの基礎

研究が進んでいない。しかしながら、菌の細胞内寄生に関わる分子機構が明らかになれば、それを標的とした新たな治療法の開発や、重篤な反応など、らい菌と宿主の相互作用による病態の変化の予測が可能になることが期待される。

らい菌は、免疫系の中核細胞の 1 つであるマクロファージに感染し、その中で潜伏・増

殖することで生体防御機構から逃れる典型的な細胞内寄生細菌である。らい菌ゲノムの全塩基配列が 2001 年に決定された結果、機能遺伝子の数が 1,604 個と極めて少ない一方で、1,116 個の偽遺伝子が淘汰されることなく残存することが明らかとなり、この点において、らい菌はあらゆる生物種の中でも最も特異な存在であることが判明した。このような少ない数の遺伝子しか持っていないらい菌が、いかにしてマクロファージ内における長期間の寄生を可能にしているかという点は未だに謎のままであるが、感染における菌と宿主間の相互作用を考える上で極めて興味深い問題であった。

申請者等は、ファゴゾーム内寄生が顕著に見られる L 型ハンセン病皮膚組織や、らい菌感染培養マクロファージにおいて、アクチン結合蛋白 CORO1A が生菌を含むファゴゾーム膜に局在し、死菌ではそれが起こらないことなどを明らかにした (*Acta Histochem Cytochem* 39: 107-112, 2006)。

CORO1A は、*M. bovis* BCG を用いた検討で phagosome-lysosome (P-L) fusion を阻害する因子であることが証明され、菌の細胞内寄生に重要な役割を果たすと考えられている (*Cell* 97: 435-447, 1999)。また、最近、らい菌感染ファゴゾーム内に豊富に存在する脂質の蓄積機構として、adipose differentiation-related protein (ADRP) の役割を明らかにした (*FEMS Microbiol Lett* 289: 72-79, 2008)。

CORO1A や ADRP は、菌の細胞内寄生を助けるために利用される宿主タンパクの代表であるが、らい菌感染マクロファージにおいては、Toll 様受容体 (TLR) などを経た自然免疫系も活性化され、菌を排除しようとする作用も働く。このようなマクロファージにおいては、TLR2 とともに CORO1A や ADRP がファゴゾームの膜上に共局在することから、菌の排除と寄生に関わるこれらの因子間に物理的あるいは機能的相互作用が存在する可能性が想定され、それを明らかにすることは感染の成立を理解するために重要であると考えられる。

一方で、宿主細胞の遺伝子発現や細胞機能に影響を与えるらい菌側の因子や、らい菌における遺伝子の発現状態やその機能に関しては大部分が未知のままであった。申請者らは、らい菌において高レベルで RNA として発現する遺伝子領域の同定を行ったところ、偽遺伝子由来する RNA も多く存在することを明らかにした (*FEMS Microbiol Lett* 259:208-214, 2006)。最近、らい菌に発現する RNA をタイリングアレイの手法を用いて詳細かつ網羅的に解析を進め、菌に高いレベルで発現する遺伝子のいくつかのクラスターを同定した (*J Bacteriol* 191:3321-3327,

2009)。これにより、種々の感染状態におけるらい菌に発現する遺伝子を解析できるようになった。

しかしながら、らい菌の細胞内寄生の詳細の大部分は不明のままであり、この点を明らかにすることが病態の理解とともに新たな治療戦略の作製にも重要である。

2. 研究の目的

ハンセン病の起菌であるらい菌は、組織マクロファージに感染し、そのファゴゾーム内で潜伏・増殖することで生体防御反応から逃れている典型的な細胞内寄生細菌である。したがって、感染マクロファージ内では、菌を排除しようとする自然免疫系の分子と、菌の生存のために利用される宿主分子との作用バランスが病態を規定していると考えられる。本研究では、感染における菌と宿主間相互作用を分子レベルで解明することで、ハンセン病の病態の理解と新たな治療戦略策定に向けた基盤とすることを目的とする。

らい菌やハンセン病に関する研究は、申請者が所属する国立感染症研究所ハンセン病研究センターが中心的な役割を果たしている。本研究の成果は、薬剤が到達しにくく既存の抗生剤による治療に限界があり、また強力な殺菌を誘導すると、らい反応のような過剰な免疫反応を惹起し臨床症状を悪化させるなどの問題があった抗酸菌を、ファゴゾーム内で静的に消化するような創薬基盤の開発にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

らい菌生菌または加熱死菌を用い、ヒト単球系細胞でありマクロファージに分化可能である THP-1 細胞に感染させ経時的に RNA およびタンパクを抽出してそれらの発現変化を解析することによって、菌と宿主の相互作用の全体像を明らかにする。また、多数の臨床検体を用いて変動する遺伝子発現を解析することにより、病態の変化や治療効果の早期判定など予後の推測に有用な検査法を確立するための研究を行う。

4. 研究成果

(1) らい菌全遺伝子の発現解析を ORF アレイを用いて実施した。アレイで得られた蛍光シグナル値は対数に変換し全プローブのシグナル中央値を得た。複数のプローブが中央値の 2 倍以上の値を示した遺伝子を抽出したところ 315 遺伝子が該当した。これらの遺伝子を機能別に分類したところ、全遺伝子の分類と類似した分布を示したが、特にエネルギー代謝やアミノ酸、核酸の合成と分解に関する分類 "Small-molecule metabolism" で発現する遺伝子の割合が低下していた。また、同一方向の DNA 鎖から発現し隣接した

3つ以上の遺伝子が2倍以上のシグナルを示した領域を抽出したところ、19ヶ所の領域を特定した。この領域には既知のオペロン4種と機能分類が同一の遺伝子で構成されている6か所の領域が含まれていた。

(2) L型ハンセン病皮膚組織切片の免疫染色では、菌を含むファゴゾーム膜上にTLR2が局在するとともに、ライソゾームとの融合を阻害する因子CORO1Aや、脂質蓄積に関与するADRPおよびperilipinなどが共局在した。

(3) THP-1細胞において、らい菌はNF-κB依存性レポーター遺伝子を活性化した。しかしながら、PGNで強く誘導されたNF-κB依存性レポーター遺伝子活性はらい菌感染により抑制された。これらのことから、らい菌は感染後に宿主蛋白を利用して自身の生存に適切な環境を構築する可能性が示唆された。

(4) らい菌生菌感染によってHSL発現および蛋白のリン酸化が強く抑制されることが明らかになり、その結果、感染細胞内の脂質の異化作用が抑えられ、菌に利用されやすい環境を作り上げることで細胞内寄生を可能にしているのでは無いかと考えられた。また、らい菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンが感染細胞上に発現するTLR2によって認識され、宿主細胞が持つ自然免疫反応が活性化することによって菌の排除機構が働くと考えられるが、らい菌の生菌感染によって、ペプチドグリカンによるTLRシグナル活性化の結果として起こる遺伝子発現変化が抑制されることも明らかにした。

(5) らい菌が持つ上記のような作用は、らい菌の加熱死菌やラテックスビーズを細胞に加えた際にも一過性には観察されたが持続的に作用することは無かった。したがって、らい菌の生菌のみが持つ何らかの因子が宿主遺伝子発現やタンパクの局在変化を誘導することによって菌のマクロファージ内寄生を可能にしているものと考えられた。

(6) ハンセン病の多剤併用療法に用いられる薬剤であるclofazimineは、らい菌が持つ種々の作用を阻害することが薬理作用の1つであることを明らかにした。

(7) 多菌型ハンセン病患者皮膚スメアから抽出したRNAを用いて上記の遺伝子発現を調べたところ、治療によってADRPが減少しHSLが増加するなど菌に不都合な細胞内環境へと変化することが明らかとなった。

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 33 件)

1. 石井則久、スマナ バルア、森 修一、永岡 譲、鈴木幸一 : WHO 第 10 回ハンセン病抑圧のための技術勧告(Technical Advisory Group: TAG)会議報告書. 日本ハンセン病学会雑誌 79, 37-42, 2010.
2. 鈴木幸一、森 修一、永岡 譲、石井則久 : 2009 年における世界のハンセン病の現況について. 日本ハンセン病学会雑誌 79, 43-51, 2010.
3. 森 修一、鈴木幸一、スマナ バルア、永岡 譲、石井則久 : ハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略. 日本ハンセン病学会雑誌 79: 53-73, 2010.
4. 石井則久、森 修一、朝比奈昭彦 : らい菌. 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査—その数値をどう読むか—第 7 版 (3) p165-167, 日本臨床社 (大阪), 2010.
5. 石井則久、小野友道 : ハンセン病の医療充実に向けた取り組み. 日本皮膚科学会雑誌 120: 1673-1674, 2010.
6. 石井則久 : サリドマイドのらい性結節性紅斑に対する保険適用に向けて. 日本ハンセン病学会誌 79: 275-279, 2010.
7. 石井則久、森 修一 : 第 1 回日本癩学会の開催日について. 日本ハンセン病学会誌 79: 281-282, 2010.
8. Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K, Nakamura K, Ishido Y, Kawashima A, Wu H, Akama T, Sue M, Yoshihara A, Mori S, Ishii N: Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains in Japan using whole genome amplification and polymerase chain reaction. PLoS ONE 5: e12422, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0012422
9. Suzuki K, Udono T, Fujisawa M, Tanigawa K, Idani G, Ishii N: Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. J Clin Microbiol 48: 3432-3434, 2010. doi: 10.1128/JCM.00017-10.
10. Akama T, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Ishii N, Suzuki K: Analysis of *Mycobacterium leprae* gene expression using DNA microarray. Microb Pathog 49: 181-185, 2010. doi: 10.1016/j.micpath.2010.05.010.
11. 前田吉民、石井則久 : ハンセン病—発熱と浸潤性紅斑を呈した 1 例. Visual Dermatology 9: 1148-1149, 2010.
12. 石井則久 : Hansen 病の検査と末梢神経検査. 皮膚病診療 32(増): 92-94, 2010.
13. 四津里英、石井則久 : ハンセン病. 治療 92: 2641-2645, 2010.

14. Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Nakamura K, Kawashima A, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y, Ishii N: Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. *Jpn J Infect Dis* 63: 387-392, 2010.
 15. 石井則久: 皮膚の抗酸菌感染症・ハンセン病. *日本皮膚科学会雑誌* 120: 2910-2912, 2010.
 16. 木庭 愛, 森 修一, 石井則久: わが国のハンセン病患者の動向. *日本ハンセン病学会誌* 80: 11-16, 2011.
 17. 石井則久, 鶴殿俊史, 藤澤道子, 伊谷原一, 谷川和也, 宮村達男, 鈴木幸一: チンパンジーとハンセン病. *日本ハンセン病学会誌* 80: 29-36, 2011.
 18. 石井則久, 森 修一: ハンセン病医学夏期大学講座の歴史. *日本ハンセン病学会誌* 80: 47-52, 2011.
 19. 四津里英, 鈴木幸一, 森 修一, 石井則久: ハンセン病の診断. *日本ハンセン病学会誌* 80: 57-70, 2011.
 20. 森 修一, 鈴木幸一, スマナ バルア, 石井則久: 2010年における世界のハンセン病の現況について. *日本ハンセン病学会誌* 80: 37-46, 2011.
 21. 石井則久, 四津里英: ハンセン病の診断と治療. *診断と治療* 99 (増刊) 336-344, 2011.
 22. 石井則久: 皮膚抗酸菌症. *日経メディカル*, p81-82, 2011年3月号.
 23. 服部玲子, 伊東由紀子, 日下秀人, 中西朝子, 中林 洋, 石井則久: 高度な鼻閉を訴えたら反応患者の1例. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 83, 75-78, 2011.
 24. 石井則久, 四津里英, 森 修一: 愛知県のハンセン病外来診療について. *日本ハンセン病学会誌* 80: 261-268, 2011.
 25. 石井則久, 石田 裕, 岡野美子, 尾崎元昭, 儀同政一, 熊野公子, 後藤正道, 野上玲子, 畑野研太郎, 山田 暁, 四津里英: らい性結節性紅斑(ENL)に対するサリドマイド診療ガイドライン. *日本ハンセン病学会誌* 80: 275-285, 2011.
 26. Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Miyamura T, Ishii N: Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. *Future Microbiol* 6:1151-1157, 2011. doi: 10.2217/fmb.11.97.
 27. Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N: Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J Dermatol* 39: 121-129, 2012. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01370.x.
 28. Tanigawa K, Yan D, Kawashima A, Akama T, Yoshihara A, Ishido Y, Makino M, Ishii N, Suzuki K: Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb Pathog* 52: 285-291, 2012.
 29. 森 修一, スマナ バルア, 鈴木幸一, 石井則久, 四津里英: 2011年における世界のハンセン病の現況について. *日本ハンセン病学会雑誌* 81: 145-154, 2012.
 30. 石井則久: ハンセン病の現状. *高知市医師会医学雑誌* 17: 12-18, 2012.
 31. 富井直子, 石田 裕, 石井則久: 日系ブラジル人に発症した BT 型ハンセン病の1例. *皮膚臨床* 54: 1212-1213, 2012.
 32. 犀川一夫, 森 修一, 石井則久: 世界ハンセン病疫病史—ヨーロッパを中心として—, p1-357, 皓星社(東京), 2012.
 33. Yang D, Akama T, Hara T, Tanigawa K, Ishido Y, Gidoh M, Makino M, Ishii N, Suzuki K: Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1936, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001936.
- [学会発表] (計 22 件)
1. 石井則久: 皮膚の抗酸菌感染症・ハンセン病. 教育講演「重要な皮膚感染症・性感染症」. 第109回日本皮膚科学会総会(大阪), 2010年4月.
 2. 谷川和也, 赤間 剛, 川島 晃, Huhehasi Wu, 須江麻里子, 石藤雄子, 石井則久, 鈴木幸一: らい菌感染マクロファージ内の脂質維持に対する hormone-sensitive lipase (HSL)の関与. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 3. 鈴木幸一, 谷川和也, 瀧川 渉, 石藤雄子, 赤間 剛, 川島 晃, Huhehasi Wu, 須江麻里子: 遺跡で発掘されたハンセン病疑い人骨からのらい菌 DNA の証明. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 4. 石井則久, 熊野公子, 杉田泰之, 永岡 譲, 野上玲子, 畑野研太郎, 細川 篤: 2009年のハンセン病新規患者発生状況. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 5. 木庭 愛, Paul E. M. Fine, 森 修一, 石井則久: わが国のハンセン病患者の動向の概観—1964年より2008年までのデータをもとに—. 第83回日本ハンセン病

- 学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
6. 石井則久、鈴木幸一、永岡 讓: ハンセン病の医療充実に向けた取り組み. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 7. 森 修一、San Shwe、Le Le Win、Kyaw Myint、鈴木幸一、石田 裕、石井則久: ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 8. 永岡 讓、田辺清勝、石井則久、矢島幹久、松崎秀男、堀江大介、宇野公男、中井淳仁、松谷有希雄: 経過中に1型らい反応を生じた高齢者のハンセン病再発例. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 9. 鈴木幸一、鶴殿俊史、藤澤道子、谷川和也、矢島幹久、宮村達男、伊谷原一、石井則久: 乳幼児期感染と約30年の潜伏期間を証明し得たLL型ハンセン病チンパンジーの1例. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会(鹿児島), 2010年5月.
 10. 石井則久: 抗酸菌感染症の最近の進歩. 日本皮膚科学会第120回山陰・第16回島根合同開催地方会(鳥取), 2010年7月.
 11. 石井則久: ハンセン病の臨床と治療. シンポジウム「感染症の病態と治療」. 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会(東京), 2011年2月.
 12. 永岡 讓、鈴木幸一、谷川和也、石井則久: 1型らい反応で再発したハンセン病の1例. 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会(東京), 2011年2月.
 13. 石井則久、熊野公子、杉田泰之、永岡 讓、野上玲子、畑野研太郎、細川 篤: 2010年のハンセン病新規患者発生状況. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会(岡山), 2011年5月.
 14. 石井則久: 日本でのサリドマイドの使用状況. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会(岡山), 2011年5月.
 15. 森 修一、石井則久: 世界のハンセン病政策に関する研究—ハワイのハンセン病政策の変遷—. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会(岡山), 2011年5月.
 16. 杉山由華、佐々木桃子、秦 まき、鈴木陽子、石井則久: 在日フィリピン人に発症したMB型ハンセン病の1例. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会(岡山), 2011年5月.
 17. Norihisa Ishii: Overview of Mycobacterioses. Workshop “Typical and Atypical Mycobacterioses”. 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, May 2011.
 18. 高塚由佳、遠田 博、前川武雄、村田 哲、小宮根真弓、大槻マミ太郎、石井則久: Hansen病(BL型)の1例. 第75回日本皮膚科学会栃木地方会例会(宇都宮), 2011年12月.
 19. 石井則久、熊野公子、杉田泰之、野上玲子、畑野研太郎、細川 篤: 2011年のハンセン病新規患者発生状況. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会(札幌), 2012年6月.
 20. 森 修一、石井則久: 国内ハンセン病療養所における入退所者数統計報告. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会(札幌), 2012年6月.
 21. 鈴木幸一、谷川和也、石藤雄子、森 修二、佐宗亜衣子、星野敬吾、櫻井準也、平田和明、石井則久: 鍋被り葬人骨からのらい菌DNAの証明. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会(札幌), 2012年6月.
 22. 吉田 紫、佐藤彰洋、榊原章浩、石井則久: ハンセン病治療歴のあるブラジル人男性に生じた斑状皮膚萎縮症の1例. 第260回日本皮膚科学会東海地方会例会(名古屋), 2012年6月.
- [図書] (計8件)
1. 石井則久: ハンセン病. 今日の治療指針2010 (山口 徹、北原光夫、福井次矢総編集), p978, 医学書院 (東京), 2010.
 2. 石井則久: ハンセン病. 六訂版家庭医学大全科 (高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次屋総合監修), p2468-2469, 法研 (東京), 2010.
 3. 石井則久: Hansen 病. 感染症専門医テキスト第Ⅰ部解説編(日本感染症学会編集), p1054-1056, 南光堂 (東京), 2011年.
 4. Akama T, Tanigawa K, Nakamura K, Kawashima A, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y, Ishii N, Suzuki K: Whole genome tiling array analysis of bacterial genome. In: Campbell MJ (Eds): DNA Microarrays, Synthesis and Synthetic DNA. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, Chapter 7: 301-315, 2011.
 5. Ishii N, Nagaoka Y, Mori S, Suzuki K: Hansen's disease in Asia. Asian skin and skin diseases (Eun HC, Kim S-C, Lee W-S ed), pp 335-342, MEDrang Inc. (Seoul, Korea), 2011.
 6. 石井則久: 抗酸菌の検出と培養法. 今日の皮膚疾患診療指針 (塩原哲夫、宮地良樹、渡辺晋一、佐藤伸一編集), p138-141, 医学書院 (東京), 2012年.
 7. 石井則久: 抗酸菌薬. 今日の皮膚疾患診療指針 (塩原哲夫、宮地良樹、渡辺晋

- 一、佐藤伸一編集), p247-250, 医学書院
(東京), 2012年.
8. 石井則久:Hansen病. 今日の皮膚疾患診
療指針(塩原哲夫、宮地良樹、渡辺晋一、
佐藤伸一編集), p824-827, 医学書院(東
京), 2012年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 則久 (NORIHISA ISHII)
国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ
ー・センター長
研究者番号: 50159670

(2)研究分担者

鈴木 幸一 (KOICHI SUZUKI)
国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ
ー感染制御部・室長
研究者番号: 20206478
森 修一 (SYUICHI MORI)
国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ
ー感染制御部・室長
研究者番号: 40559522