

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461708

研究課題名(和文)らい菌の細胞内寄生機構の解明とそれを応用したハンセン病検査法の開発

研究課題名(英文)Studies on intracellular parasitization of Mycobacterium leprae for the development of laboratory examination of leprosy

研究代表者

石井 則久 (Ishii, Norihisa)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：らい菌を培養マクロファージに感染させることで変動する遺伝子をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析し、転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptors PPAR- α とPPAR- γ とともに、その下流に存在する脂質代謝に関連する遺伝子群の発現が強く誘導されることを証明した。多菌型ハンセン病患者の皮膚スミアからmRNAを抽出してそれら遺伝子の発現をRT-PCRで検討したところ、患者検体では正常に比べ発現量が増加しており、多剤併用療法によって正常化していたことから、本法が病態や治療効果判定に有用な検査法となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：We performed DNA microarray analysis of Mycobacterium lepra (M. leprae)-infected cultured macrophage cells. We found that mRNA expression of transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α and PPAR- γ) and their downstream genes related to lipid metabolism were significantly induced following M. leprae infection. We then purified mRNA from skin smear samples taken from multibacillary patients and analyzed mRNA expressions of those genes essential for lipid accumulation by RT-PCR. The expression of those genes was significantly induced in the patients, but returned to normal level after multi-drug therapy. These results suggest that RT-PCR analysis of these genes would be an useful tool for the laboratory examination to evaluate disease states of leprosy patients and also to evaluate efficacy of treatment.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ハンセン病 らい菌 細胞内寄生 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、公衆衛生の改善や WHO が推進する多剤併用療法 (multidrug therapy: MDT) の普及などにより世界的に患者数は大幅に減少した。しかしながら、世界の新患者数は未だ年間 20 万人前後推移している。

起因菌である「らい菌」は、主に多菌型患者から排菌された菌が呼吸器系を介して感染し、数年から数十年の間、体内のどこかに潜伏した後に主に真皮上層で泡沫化した組織球 (組織マクロファージ) に感染した状態で発症する。すなわち、らい菌は免疫反応の中核の細胞であるマクロファージのファゴソーム内で、大量の脂質とともに存在し、免疫反応やライソソームにおける分解を逃れて細胞内に寄生し増殖するという特徴を有している。

しかしながら、未だ菌の培養法が確立されておらず、またその細胞内寄生機構の大部分が不明であることなどから、新たな方法の模索や有効な治療戦略の策定が出来ないのが現状である。同様に、治療効果の判定や、免疫学的に常に変動するハンセン病の病型やらい反応の出現を予測できるような検査法も無く、それらの開発が求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、らい菌感染後のマクロファージに発現する遺伝子を DNA マイクロアレイによる網羅的解析をおこない、らい菌の生菌のみが関与し死菌では起こらない宿主遺伝子発現変化の全体像を明らかにするとともに、菌の細胞内寄生を規定する因子を同定することを第 1 の目的とする。

(2) 次いで、患者皮膚スミア材料を用いてそれらの遺伝子発現状態を確認し、治療効果や予後判定に有用な検査法を確立する事を第 2 の目的とする。

3. 研究の方法

(1) らい菌の生菌と加熱死菌を用い、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に感染させ、経時的に mRNA を精製し、遺伝子発現を Agilent Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイで解析する。宿主マクロファージにおいて、らい菌生菌でのみ変動し加熱死菌では変化しないものを抽出し、遺伝子発現の経時的変動の相関関係を real time PCR および Western blotting で明らかにする。また、その機能を実際に検証するために、見出した因子のアゴニストやアンタゴニスト等を用いることによってそれら因子が実際に細胞内脂質蓄積に関与するかについてオイルレッド O 染色によって評価する。

(2) 最終的に、同定された宿主因子の発現状態をハンセン病患者の皮膚スミアや組織において評価することで、臨床上重要な予後

や治療効果などを精度良く予測することが可能となるような検査法の開発のための検討を行う。

4. 研究成果

(1) らい菌の生菌と加熱死菌をそれぞれヒト単球系細胞でありマクロファージに分化可能な THP-1 細胞に添加し、培養前後の細胞から mRNA を精製し DNA マイクロアレイ解析を行い、得られた膨大なデータを解析ソフト GenMAPP などを用いて生物情報学的解析および統計学的解析を行った。

その結果、未処置の THP-1 細胞と比べ、死菌を添加した細胞では 73 の遺伝子の発現が増加し、13 遺伝子の発現が減少したのみであったが、生菌を感染させた細胞では、それぞれ 1085 種と 790 種の遺伝子発現が有意に変動しており、らい菌生菌は死菌に比較して宿主細胞の遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることが判明した。

(2) その中で特に、転写因子である peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) によって制御される脂質関連遺伝子群の発現が大きく変動していることがわかり、その mRNA 変動を real time PCR で、タンパク変動を Western blotting で確認した。

そこで、PPAR- α 、PPAR- β 、PPAR- γ および脂質の輸送に直接関連する遺伝子群の発現がらい菌感染後にどのように変化するか real-time PCR によって確認したところ、らい菌を感染させると PPAR- α と PPAR- β の mRNA 発現が誘導されることが明らかになった。らい菌の加熱死菌ではそのような誘導は起こらなかった。

(3) また、PPAR シグナルの活性化がマクロファージにおいて脂質蓄積を誘導できるかどうかを調べるために、PPAR のアゴニストで THP-1 細胞を処理すると、細胞内に大量の脂質蓄積が誘導されることがオイルレッド O 染色により明らかになった。

これらの結果より、らい菌が宿主マクロファージに感染することにより、脂質代謝や免疫反応に関わる転写因子である PPAR- α と PPAR- β の発現を誘導することでファゴソーム内に脂質を蓄積・維持し、菌の細胞内寄生機構に有利な環境を構築することが明らかになった。

(4) さらに、PPARs によって発現が誘導される下流の遺伝子群にもらい菌感染が影響を与えるかどうかについて検証を行ったところ、脂質代謝に関わる遺伝子のうちこれまでらい菌感染による発現誘導が報告されていなかった複数の遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。

(5) 最後に、多菌型ハンセン病患者の皮膚

スミア検体から得られた mRNA を解析することによって、患者検体では実際にそれらの遺伝子発現が増強していること、および多剤併用療法後に正常化することなどを明らかにすることができた。

(6) 本研究により、らい菌感染後の細胞内寄生およびそれに重要な細胞内環境を提供するファゴソーム内の脂肪滴蓄積が、PPAR- と PPAR- の誘導を経てその下流の遺伝子群の発現を誘導することで起こっているというメカニズムを解明した。

また、ハンセン病患者の皮膚スミア材料において培養細胞で同定した上記の現象が起こっていることが確認されたことから、これらの変動を RT-PCR 法によって検討することで患者の病態や予後を反映する検査法として使用できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Mitjã O, Marks M, Bertran L, Kollie K, Argaw D, Fahal AH, Fitzpatrick C, Fuller LC, Garcia Izquierdo B, Hay R, Ishii N, Johnson C, Lazarus JV, Meka A, Murdoch M, Ohene SA, Small P, Steer A, Tabah EN, Tiendrebeogo A, Waller L, Yotsu R, Walker SL, Asiedu K: Integrated control and management of neglected tropical skin diseases. PLoS Negl Trop Dis 11: e0005136, 2017.

Hattori M, Motegi S, Amano H, Ishii N, Ishikawa O: Borderline lepromatous leprosy: Cutaneous Manifestation and type 1 reversal reaction. Acta Derm Venereol. 2016 Mar 1;96(3):422-423. doi: 10.2340/00015555-2251.

石井則久: 抗酸菌感染症. JOHNS 32: 1553-1555, 2016.

〔学会発表〕(計 13 件)

石井則久: 新興・再興感染症 - 結核、ハンセン病、ブルーリ潰瘍など - . 第 115 回日本皮膚科学会総会, 2016 年 6 月. 京都.

Y. Luo, K. Suzuki. *Mycobacterium leprae* creates a lipid-rich intracellular environment via activating peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and PPAR signal pathways in host macrophages. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23-25 日. 大阪.

Y Luo, K Ishikawa, K Oda, A Yoshihara, K Usukura, K Sekihata, M Yoshizato, K Tanigawa, Y Ishido and K Suzuki. Peroxisome proliferator-activated

receptor (PPAR) and PPAR function in *Mycobacterium leprae*-induced foam cell formation in host macrophages. 第 48 回アジア太平洋公衆衛生学術連合国際会議 (APACPH 2016). 2016 年 9 月 16-19 日. 東京.

〔図書〕(計 5 件)

Yotsu RR, Ishii N, Rajagopalan S: Leprosy. Taylor and Kelly's Dermatology for Skin of Color, 2nd Ed, (Kelly AP, Taylor SC ed.) pp469-474, McGraw-Hill Education, New York, 2016.

鈴木幸一, 松村充. ハンセン病. 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会 監修、検体採取者のためのハンドブック (JAMT 技術教本シリーズ). じほう. 71-74, 2016.

石井則久: ハンセン病. Q&A 皮膚科診療ケースファイル - 見逃しやすい症例 51(川田 暁編集), p59-60, 金芳堂(京都), 2015 年.

石井則久: ハンセン病. 今日の治療指針 2014(福井次矢、高木 誠、小室一成総編集), p1122-1123, 医学書院(東京), 2014 年.

石井則久, 四津里英, 菅原万理子: 稀だけど見逃してはいけない抗酸菌症. 感染症内科 2: 84-90, 2014.

四津里英, 石井則久, 玉木 毅: 抗酸菌の検査. MB Derma 216(増): 103-112, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 則久 (ISHII, Norihisa)

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 (SUZUKI, Koichi)

帝京大学・医療技術学部臨床検査学科・教授

研究者番号： 20206478

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()