

らい菌のマクロファージ内寄生分子機構における peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) シグナルの関与

研究者氏名：駱 予倩

所属機関名：国立感染症研究所ハンセン病センター

要 旨

ハンセン病の起因菌であるらい菌が、自然免疫反応の中核であるマクロファージ内に寄生するという最も典型的な細胞内寄生細菌であるが、その分子機構は未だ不明である。らい菌に感染したマクロファージをDNAマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、脂質蓄積に密に関わる種々の宿主遺伝子発現が特異的に変動することがわかった。これらの遺伝子は、一つ共通の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) によって調節されると知られている。したがって、本研究ではPPARシグナルがらい菌の細胞内寄生への関与について検討した。その結果、らい菌感染後PPAR- γ とPPAR- δ との活性化がマクロファージ内脂質蓄積を誘導することが示唆された。また、臨床検体を用いPPARシグナルの標的宿主遺伝子ADRPの実的な発現量を治療前後等経時的に評価したところ、ハンセン病治療前に検出されたが、治療後検出されない程度に減少したことが明らかになった。一方、感染後特異的な宿主遺伝子発現は、ハンセン病の病型や予後を推測する新規biomarkerになると考えられるため、PPARs標的遺伝子ADRPの発現レベルを多数のハンセン病患者から採取した検体で治療前後等経時的に評価した。

Key Words らい菌、マクロファージ、脂質代謝、PPARsシグナル、ハンセン病

緒 言：

ハンセン病は、抗酸菌の一種であるらい菌に感染することによって起こる慢性の感染症である。らい菌は、自然免疫反応の中核であるマクロファージの細胞内に寄生するという最も典型的な細胞内寄生細菌であるが、何故免疫監視機構を逃れてそのような細胞内寄生が可能であるのかについてはほとんどわかっていない。所属研究室これまでの研究で、らい菌感染によって宿主マクロファージにおける菌の細胞内寄生に関わると考えられる遺伝子発現が大きく変化することを明らかにしてきた(1-5)。らい菌の加熱死菌やコントロールとして用いた菌とほぼ同じサイズの粒子であるラテックスビーズによっても一過性に遺伝子発現が変化するがすぐに元に戻り、らい菌の生菌によってのみ遺伝子発現変化が持続することがわかってきた。タンパクの発現変化も同様であった。これらのことから、らい菌は感染した宿主の遺伝子発現変化を持続的に誘導することによって、自身の寄生に都合の良い細胞内環境を構築するものと考えられた。そのようならい菌生菌に特異的な遺伝子発現変化の全体像を解明するため、らい菌の生菌あるいは死菌で宿主細胞であるマクロファージに感染させた後、宿主細胞の遺伝子変化をDNAマイクロアレイで網羅的に解析した。そこで、脂質蓄積に密に関わる種々の宿主遺伝子発現が特異的に変動することがわかった。これらの遺伝子は、一つ共通の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) によって調節されると知られている。したがって、本研究ではPPARシグナルがらい菌の細胞内寄生への関与について検討を行った。

対象と方法：

先行研究で得られた DNA マイクロアレイのデータで、複数の PPARs シグナルの標的遺伝子発現がらい菌に特異的に変動することが明らかになった。これらの結果に基づいて、本研究で、まず、ヒトのマクロファージ前駆細胞である THP-1 細胞において、らい菌感染後 PPAR 転写因子ファミリーメンバー(PPAR- α

と PPAR- δ と PPAR- γ)と標的遺伝子それぞれの発現変動をリアルタイム PCR により調べた。さらに、PPARs の阻害剤または刺激剤を用い、細胞内脂質蓄積の変化を評価し、らい菌の細胞内寄生における PPAR シグナルの関与を検討した。

中国の共同研究者が、倫理委員会の承認および患者の同意を得て種々の病態や治療前後に採取した皮膚スミア検体を 15 例収集した。これらの検体から精製した RNA を用い、らい菌の細胞内寄生に重要な PPARs 標的遺伝子 ADRP の実際な発現量をリアルタイム PCR により評価した。

結果：

1) 感染後 PPARs 標的遺伝子らの発現変化が確認された。DNA マイクロアレイで明らかになった脂肪細胞

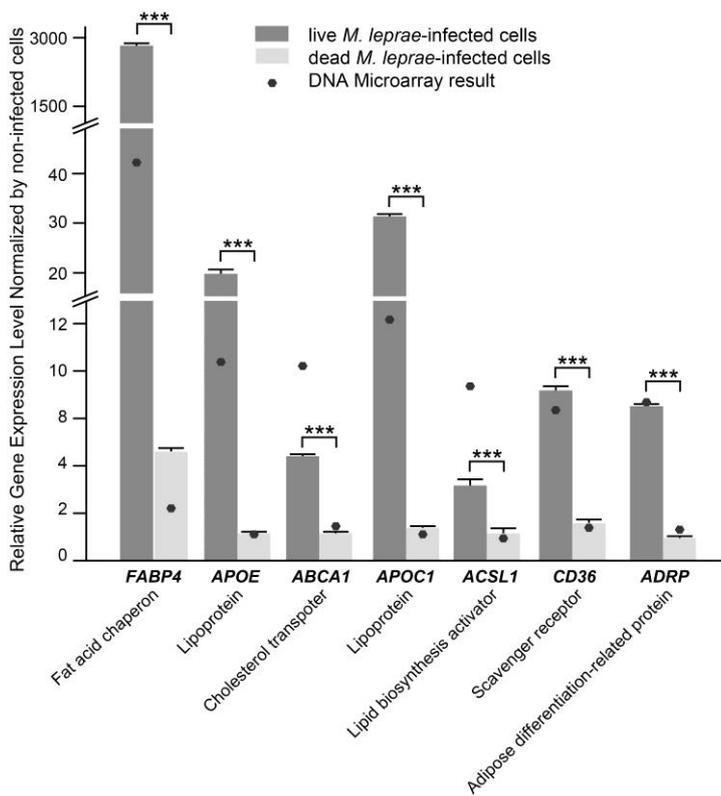


図 1、Real-time PCR により、DNA マイクロアレイで同定した各種 PPARs 標的遺伝子の mRNA 発現量を調べた。各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH でノーマライズした。Bars: real-time PCR データ。Dots: DNA マイクロアレイデータ。***: $p < 0.001$ 。

内因性リガンドまたは様々な合成的外在性リガンドとの結合により活性化され、retinoid X receptor (RXR) とヘテロを形成し、peroxisome proliferator hormone response elements (PPREs) という標的遺伝子 DNA 上の特定領域に結合し、標的遺伝子の転写を調節する。THP-1 細胞や人皮膚角化細胞において、PPAR- δ の激动剤が ADRP の発現を誘導し細胞内脂質の蓄積を促進することが報告された。分子クローリング研究により ADRP の DNA 上に PPREs の配列も確認された。また、脂質代謝調節機能のほかに、PPAR- γ と PPAR- δ がヒトマクロファージにおいて nuclear factor- κ B シグナルに拮抗し自然免疫反応を抑制する機能も報告された。このような PPARs シグナルがらい菌の脂質誘導機能および自然免疫反応抑制機能に関与するかどうかについてはいまだ報告がない。それを調べるために、まず、THP-1 細胞にらい菌の生菌と加熱死菌 (菌の数/細胞数=100/1) を別々に 6 時間または 48 時間感染させ、感染前と感染後の THP-1 細胞から total RNA を精製し、real-time PCR で PPAR- α と PPAR- γ と PPAR- δ の mRNA 発現量を調べた。その結果、らい菌の生菌が特異的に PPAR- γ と PPAR- δ の mRNA 発現を誘導したことが明らかになった (図 2)。

分化(adipocyte differentiation)マーカーとして知られており、脂質の生成や取り込み、輸送に働くいくつかの遺伝子(ADRP, FABP4, ACSL1, CD36, APOE, APOC)の mRNA 発現量がらい菌の生菌のみに強く誘導されたことがわかった。これらの遺伝子の発現変化が、検出精度のより高い real-time PCR によりも確認された (図 1)。らい菌の生菌がこれらの遺伝子を誘導することにより、脂質の豊かな細胞内環境を作り上げることが示唆された。

2) PPAR- δ と PPAR- γ がらい菌の生菌の宿主遺伝子調節機能に関与することが示唆された。

らい菌の生菌の感染で発現が強く誘導された遺伝子: ADRP, FABP4, CD36, APOE, APOC が、peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) という転写因子により転写が調節されることが多くの文献で報告された(6-10)。PPARs (PPAR- α と PPAR- δ と PPAR- γ という 3 つのメンバーがある)が、核受容体の一種のことであり、脂質の細胞内代謝や細胞の分化に密接に関与している転写因子であるとされている。PPARs は、遊離脂肪酸などの

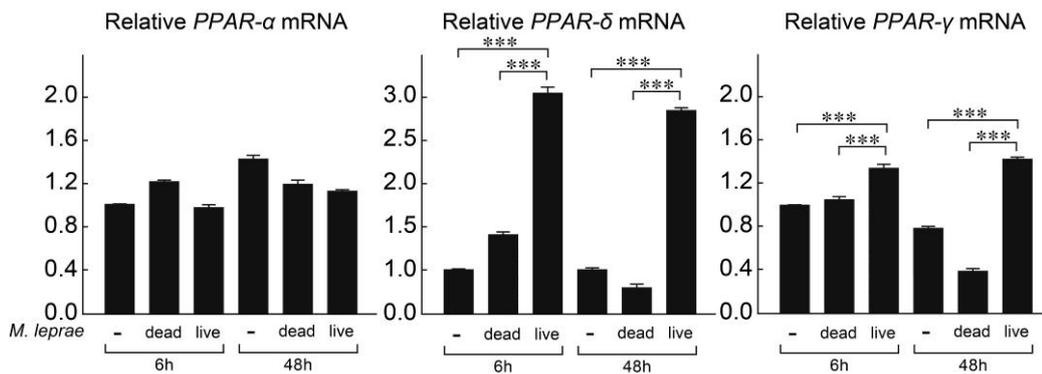


図 2、らい菌の死菌または生菌の感染による宿主細胞の PPARs 発現変動。THP-1 細胞に、らい菌の生菌と加熱死菌（菌の数/細胞数=100/1）を別々に 6 時間または 48 時間感染させ、感染前と感染後の THP-1 細胞から total RNA を精製し、real-time PCR により上記の遺伝子の mRNA 発現量を調べた。各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH でノーマライズした。***: $p < 0.001$ 。

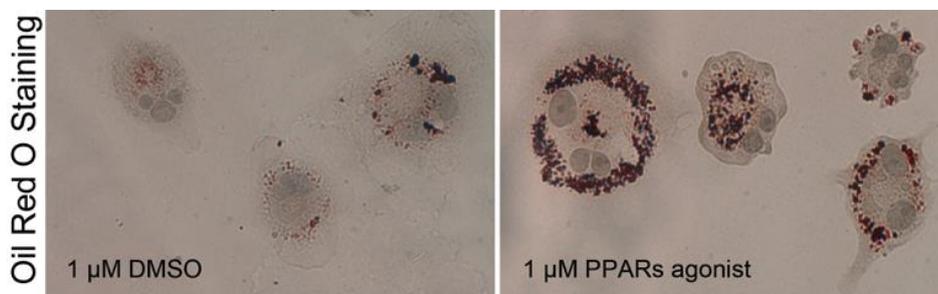


図 3、PPARs agonist がマクロファージ内脂質蓄積を誘導する。1 μM DMSO または 1 μM L-165,041 (Sigma, L2167) を用い、THP-1 細胞を 48 時間処理し、オイル赤 O 染色により、細胞内脂質蓄積を評価した。細胞核はヘマトキシリンで染色した。写真のオリジナル拡大倍数は X400 である。

3) PPARシグナルの活性化がマクロファージ内脂質蓄積を誘導する。 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シグナルの特異的

刺激剤 L-165,041 (Sigma, L2167) を用い、マクロファージを処理48時間後、オイルレッドO染色により、細胞内脂質蓄積を評価したところ、1 μM DMSO処理のコントロールと比べたら、1 μM L-165,041処理のマクロファージでは、脂質が大量に誘導されたことが明らかになった(図3)。

4) ADRP発現がハンセン病治療前に検出さ

れたが、治療後検出されない程度にまで減少した。ハンセン病の予後や治療効果の判定に役立つ遺伝子を同定するための検討を行うために、ハンセン病治療前後の患者からの皮膚検体における PPARs 標的遺伝子の実際の発現レベルを調べた。上海皮膚病病院の医師の協力を得て、臨床検体採取が行われた。倫理委員会で承認され患者へのインフォームドコンセントを得て、一年間をわたって、様々なハンセン病の臨床病型を持っておられる患者さん(総計15名)から、ハンセン病治療前と八月間の治療完了後に皮膚

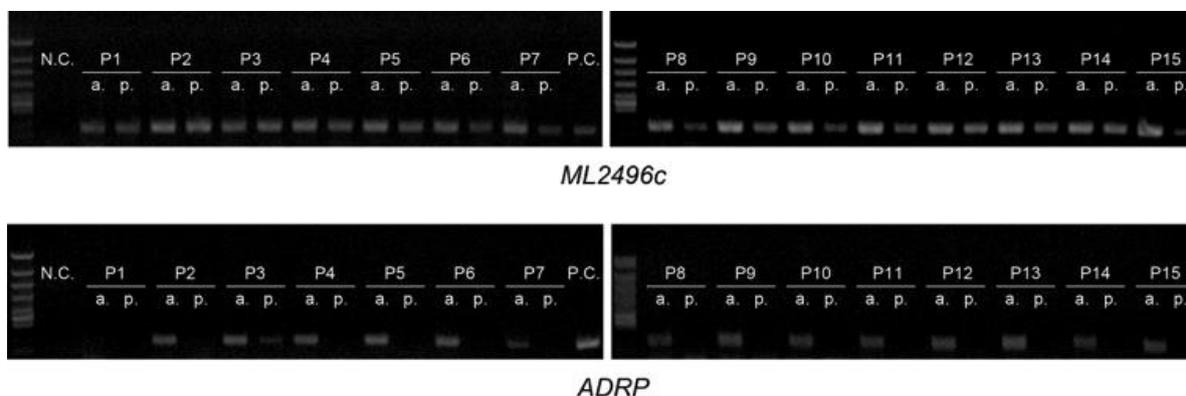


図 4、ハンセン病治療後 ADRP の発現が検出されない程度に減少した。患者さん(総計 15 名)から、ハンセン病治療前後に皮膚スミア検体を採取した。これらの検体から RNA を精製し、らい菌の遺伝子 *ML2496c* (上) および PPARs の標的遺伝子 *ADRP* (下) の実際の発現レベルを RT-PCR で検査した。N.C.: negative control, P.C.: positive control, P1, P2, P3, ... P15: 患者 1、患者 2、患者 3、... 患者 15。a.: 治療前。p.: 治療後。

スミア検体の採取を行った。採取された皮膚スミア検体はRNA抽出までは70%エタノールに保存されていた。これらの検体からRNAを精製し、らい菌の遺伝子*ML2496c*およびPPARsの標的遺伝子*ADRP*の実験的な発現レベルをRT-PCRで検査した。その結果、抗菌薬で治療して菌は死滅したと考えられた後でも、残存する菌体の遺伝子*ML2496c*はRT-PCRにより検出された(図4)。一方、治療前に*ADRP*の発現は検出されたが、治療後に*ADRP*の発現は検出されない程度に減少した(図4)

考 察 :

本研究によって、脂質代謝や免疫反応に関わる転写因子であるPPAR- δ とPPAR- γ がらい菌のマクロファージ内寄生機構に関与することが明らかになった。また、PPAR- δ とPPAR- γ との標的遺伝子である*ADRP*がハンセン病治療効果を評価するための臨床検査biomarkerとして有用であることが示唆された。

参考文献 :

1. Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem* 39(4):107-112, 2006.
2. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S, Ikuyama S, Ito T, Ishii N. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 289(1):72-79, 2008.
3. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, Kawashima A, Ishii N. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol* 156(3):495-501, 2009.
4. Degang Y, 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(12):e1936, 2012.
5. Tanigawa K, Degang Y, 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(5):285-291, 2012.
6. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93(2):241-252, 1998.
7. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275(3):1873-1877, 2000.
8. Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 276(47):44258-44265, 2001.
9. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(6):E1195-1205, 2005.
10. Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 1728(1-2):95-104, 2005.

注 : 本研究は、2015年6月10日『6th Congress of European Microbiologists』にて口演発表した。

作成日 : 2016年 3月6日