

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15132

研究課題名(和文)血清exosomeによる潜在性結核のバイオマーカー分子の探索

研究課題名(英文)The biomarker candidates of latent tuberculosis in exosomes from human serum

研究代表者

岡 真優子(Osada-Oka, Mayuko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：40347498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：休眠期結核菌の感染する無症候状態の潜在性結核は、宿主の免疫力低下に伴い再び増殖して結核を発症するため、結核の重要なリスクファクターとなっている。しかし、正確に潜在性結核を診断できないことから、本研究では結核菌感染マクロファージの分泌する細胞外小胞exosomeに着目し、この診断を可能とするバイオマーカーの探索を行った。

増殖期および休眠期結核菌のマクロファージへの感染は、炎症性マーカーと抗炎症マーカーを誘導しエキソソーム中に内包されているタンパク質を増大させた。またそのタンパク質には、結核菌感染時に特異的に内包される9個のマウス由来抗原が見つかった。

研究成果の概要(英文)：The asymptomatic group, which is called latent infection of Mycobacterium tuberculosis (LTBI), is recognized as vitally important in controlling TB, because a majority of cases develop from latent infections. Thus, it has been required new diagnostic method to exactly establish LTBI. In this study, we examined the biomarker-targeted protein into macrophage-derived exosomes. After infection with active or latent Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin, the expressions of both inflammatory and uninflamatory factor were up-regulated in RAW264.7 macrophages. Therefore, the protein were increased in exosomes from BCG-infected macrophages (BCG-exo) compared with exosomes from uninfected macrophages (none-exo). Moreover, it was identified 9 proteins, which is in BCG-exo derived from BCG-infected macrophages.

研究分野：生体防御機能学

キーワード：結核 マクロファージ エキソソーム バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 潜在性結核は、休眠期結核菌(休眠菌)の感染する無症候状態の結核菌感染症である。世界保健機構は、世界人類の3分の1が休眠菌に感染していることが報告されており、感染者の10%は一生で結核を発症するとされている。そのため潜在性結核に対処することは重要な課題であるが、未だ休眠菌の感染を正確に診断できない。これまでに申請者らは、休眠菌の必須因子 Mycobacteria DNA-binding protein1 (MDP1) 抗原に対する免疫グロブリン G の血中レベルが、潜在性結核患者で高いことを見出した(Osada-Oka M. Microbiol Immunol. 2013)。しかし、MDP1 タンパク質が、潜在性結核患者の血清中に存在するかについては不明である。

(2) 結核菌はマクロファージ内で増殖および休眠する細胞内寄生菌である。様々な細胞から分泌される細胞外小胞エキソソームには、分泌細胞由来のタンパク質や核酸が含まれており、マクロファージもまたエキソソームを血中に分泌する(Osada-Oka M. Hypertension Res. 2017)。これまでに、結核菌の感染するマクロファージから増殖期結核菌抗原(ESAT6)が、エキソソームに内包され細胞外へ分泌されることが報告された。しかし、休眠菌は、ESAT6 を発現しない。したがって、休眠菌感染マクロファージのエキソソームには、増殖期結核菌と異なる抗原がある可能性を考える。

(3) 活性化マクロファージには、2つの異なるサブタイプ(M1とM2)が存在し、M1マクロファージが炎症性サイトカインを産生して殺菌作用を示すのに対し、M2マクロファージは抗炎症性サイトカインを産生することが知られている。これまでに、結核菌の持続潜伏感染する肉芽腫にはM2マクロファージが多く集積していることが知られている。しかし、増殖期結核菌と休眠菌の感染するマクロファージのサブタイプについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

現在、結核菌(特に休眠菌)感染でのエキソソームの解析は行われていない。結核菌が感染したマクロファージ由来エキソソームには、宿主細胞由来のタンパク質や核酸に加え、菌由来の様々な分子が存在する可能性が高い。特に、増殖期または休眠期の結核菌は、発現するタンパク質が異なるため、エキソソームに含まれる抗原タンパク質にもそれぞれの特徴があると考えられる。これまで、増殖期結核菌または休眠菌が感染するマクロファージでのプロテオーム解析やゲノム解析は行われているが、それぞれの結核菌の感染するマクロファージが分泌するエキソソームを比較した研究はないことから、新しい潜在性結核のバイオマーカー分子の同定が期待

できる。マクロファージ由来エキソソーム中のタンパク質を網羅的に解析し、休眠菌の感染する潜在性結核のバイオマーカー分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 結核菌感染によるマクロファージの活性化

本研究では、ヒト型結核菌 Mtb ならびに増殖期または休眠期のウシ型結核菌 BCG をマウスマクロファージ(RAW264.7)に multiplicity of infection (MOI) 値 1~5 で感染後、マクロファージに発現する炎症性サイトカインまたは抗炎症性サイトカインのタンパク質および mRNA 発現を Western blotting 法および定量的 real-time PCR 法で解析した。また、マクロファージを M1 へと分化させることが知られている大腸菌を MOI 値 0.5 で感染させて対象に用いた。

(2) マクロファージ由来エキソソームの物性解析

増殖期または休眠期のウシ型結核菌 BCG が感染したマクロファージの培養上清から、エキソソームを超遠心法および比重遠心法で精製した。このとき、非感染マクロファージならびに大腸菌感染マクロファージ由来エキソソームを同様に調製した。各エキソソームのタンパク質量は BCA 法で測定し、また粒子径は Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Kobe, Japan) を用いて解析した。さらに、エキソソームマーカー分子の発現は、Western blotting 法で解析した。

(3) マクロファージ由来エキソソームのプロテオーム解析

マクロファージ由来エキソソームを超遠心法により精製した。得られたエキソソームはメタノールおよびクロロホルムを加えて脱脂した後、沈渣として得られた蛋白質を質量解析した。解析には、Scaffold (Proteome Software 社製) を用いた。

4. 研究成果

(1) まず、ウシ型結核菌 BCG を MOI 値 5 で RAW264.7 細胞に感染 24 時間後、炎症型 M1 マクロファージマーカー分子の発現を調べた。その結果、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の mRNA ならびにタンパク質の発現は BCG 感染により増大したが、大腸菌感染に比べて低いレベルであった。また、ヒト型結核菌 Mtb を MOI 値 1 で感染後の iNOS タンパク質発現の増大も確認できた。さらにシクロオキシゲナーゼ-2の発現は、大腸菌感染で増大したが、BCG ならびに Mtb 感染による増大はほとんどなかった。これら M1 マーカー分子の発現は、休眠期と増殖期で違いがなかった。一方、M2 マクロファージマーカーのマンノースレセプターは、大腸菌およびすべての BCG 感染で増大しなかった。また、大腸菌感染で誘導された炎症性サイトカイン(M1 マーカー)のイ

ンターロイキン-6(IL-6)、IL-8およびIL-12 mRNAは、BCG感染では誘導されなかった。一方、抗炎症サイトカイン(M2 マーカー)のIL-10は、大腸菌感染よりもBCG感染で強く誘導された。よって、結核菌によるM1への活性化は大腸菌感染時に比べて弱く、また結核菌は抗炎症作用を促していることが明らかになった。

(2) 増殖期BCG感染マクロファージ由来エキソソーム(BCG-exo)のタンパク量は、非感染マクロファージ由来エキソソーム(none-exo)のタンパク量よりわずかに増大した。また、大腸菌感染マクロファージ由来エキソソーム(E. coli-exo)は、BCG-exoよりタンパク量が高かった。しかし、3種のエキソソームに有意な差はなかった。また、エキソソームマーカー分子としてよく知られているheat shock protein 90(HSP90)およびCD9の各発現はほぼ同レベルであった。一方、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の発現は菌の種類によらず感染によって増大する傾向が見られた。次に、各エキソソームの粒子径分布を測定した結果、3種は全て30~100nmに分布していた。また、増殖期と休眠期のBCG感染マクロファージのエキソソームには差はなく、よって各エキソソームの物性に大きな差はないことがわかった。

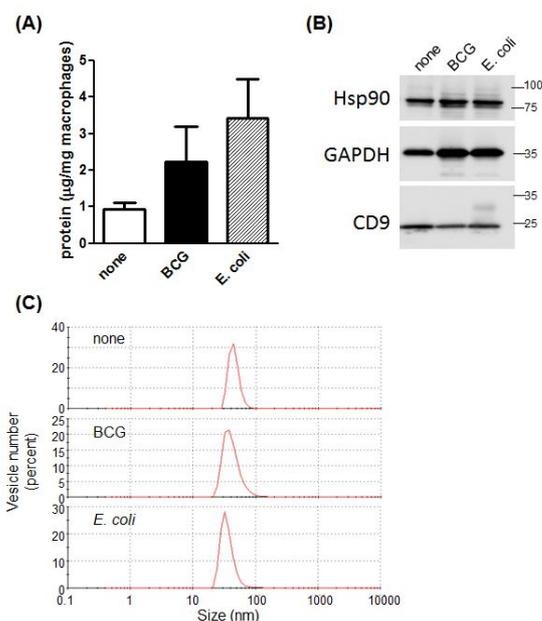


図1 マクロファージ由来エキソソームの物性解析
増殖期ウシ型結核菌 BCG または大腸菌を 18 時間 RAW264.7 マクロファージ細胞に感染 (MOI 値 5 または 0.5) させた後、回収した培養液からエキソソーム (BCG-exo, E. coli-exo) を精製した。また、非感染マクロファージ由来エキソソーム (none-exo) を回収した。(A) 感染させたマクロファージのタンパク量 (mg) 当たりのエキソソームタンパク量 (µg) を mean ± SE (n=3-9) で表した。

(B) 各エキソソームに発現するエキソソームマーカー分子 (HSP90、GAPDH、および CD9) を Western blotting 法により検出した。(C) 各エキソソームの粒子径とその個数 (%) を Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments) を用いて測定した。

(3) 増殖期 BCG 感染マクロファージが分泌するエキソソームのプロテオーム解析を行った。BCG-exo には 93 個の Maus 由来蛋白質が検出された。そのうち E. coli-exo ならびに none-exo に共通して存在した 77 の蛋白質を除外し、BCG-exo にのみ存在した 16 個を結核菌感染バイオマーカーの候補蛋白質として同定した。BCG-exo と none-exo に共通して存在する蛋白質には、HSP90 および GAPDH を含むエキソソームのマーカー分子が含まれていた。現在、これら 16 個のタンパク質の発現を、増殖期と休眠期の BCG 感染エキソソームで比較している。

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 6 件)

Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, Nishiyama M, Tanaka M, Yamaguchi T, Sakurai E, Miura K, Iwao H. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertension conditions. *Hypertens Res.*, 査読有, 40, 2017, 353-360. doi: 10.1038/hr.2016.163.

Osada-Oka M. Defense tactics in latent infection of *Mycobacterium tuberculosis*. *植物細菌病談話会論文集*, 査読有, 27, 2016, 3-11.

Ozeki Y, Igarashi M, Doe M, Tamaru A, Kinoshita N, Ogura Y, Iwamoto T, Sawa R, Umekita M, Enany S, Nishiuchi Y, Osada-Oka M, Hayashi T, Niki M, Tateishi Y, Hatano M, Matsumoto S. A new screen from tuberculosis drug candidates utilizing a luciferase-expressing recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gueren. *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0141658. doi: 10.1371/journal.pone.0141658.

Tateishi Y, Osada-Oka M, Tanaka M, Shiota M, Izumi Y, Ishimura E, Motoyama K, Inaba M, Miura K. Myeloid HIF-1 attenuates the progression of renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *J Pharmacol Sci.*, 査読有, 127, 2015, 181-189. doi: 10.1016/j.jphs.2014.12.011.

Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamazaki T, Shiota M, Sano S, Tanaka M, Osada-Oka M, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction., *Int J Cardiol.*, 査読有, 15, 2015, 239-46.
doi: 10.1016/j.ijcard.2014.10.144.

Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Yamashita N, Nakamura Y, Shiota M, Tanaka M, Sano S, Osada-Oka M, Shimada K, Wanibuchi H, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Percutaneous carbon dioxide treatment using a gas mist generator enhances the collateral blood flow in the ischemic hindlimb. *J Arterioscler Thromb.* 査読有, 127, 2015, 474-480.
doi: 10.5551/jat.23770.

〔学会発表〕(計 10 件)

Osada-Oka M, Kimura Y, Yakura D, Shinzawa N, Horiguchi Y, Ichikawa H, Minamiyama Y. *Echerichia coli*-derived outer membrane vesicles cause the proinflammatory signal mediated by exosomes in macrophages. 第 90 回日本細菌学会, 2017 年 3 月 19~21 日, 仙台国際センター展示場 (宮城県・仙台市).

Osada-Oka M. Defense tactics in latent infection of *Mycobacterium tuberculosis*. 日本植物病理学会 第 27 回植物細菌病談話会, 2016 年 10 月 24~25 日, 京都府立大学(京都府・京都市).

Osada-Oka M, Yakura D, Kimura Y, Minamiyama Y, Ichikawa H. The exosomes from *Echerichia coli*-infected macrophages play a role in activation of non-infected macrophages. 5th Young Researchers Forum on Infectious Diseases, 2016 年 9 月 4~6 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市).

Yakura D, Osada-Oka M, Minamiyama Y, Ichikawa H. The exosomes from *Echerichia coli*-infected macrophages play a role in activation of non-infected macrophages through MyD88. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 2016 年 5 月 12~14 日, Hwarang Hall BC in The-K Hotel Gyeongju (Gyeongbuk, Korea).

岡 真優子, 尾関百合子, 山口雄大, 松本壮吉. Hypoxia-inducible factor-1 in

macrophages suppresses intracellular growth of *M. tuberculosis*. 第 89 回日本細菌学総会, 2016 年 3 月 23~25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).

Yakura D, Osada-Oka M, Ichikawa H. Exosomes transmit infection signal cell-to cell via the MyD88-dependent signal pathway. 第 89 回日本細菌学総会, 2016 年 3 月 23~25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).

Osada-Oka M, Ozeki Y, Matsumoto S. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* infection. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: 50th Anniversary Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting, 2016 年 1 月 13 日~14 日, Bethesda, USA.

櫻井絵未, 岡 真優子, 田中昌子, 山口雄大, 塩田正之, 岩尾 洋, 三浦克之, 泉康雄. 高血圧ラットの血中エキソソームは内皮細胞の炎症を惹起する. 第 128 回日本薬理学会近畿部会, 2015 年 11 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)

岡 真優子, 大西 愛, 石井美菜子, 尾関百合子, 松本壮吉, 三角和広, 市川 寛, 南山幸子. 高グルコースによる結核菌の NO 抵抗性と増殖作用. 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2015 年 6 月 11~12 日, 鹿児島県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市).

Osada-Oka M, Ozeki Y, Ichikawa H, Minamiyama Y, Matsumoto S. The replication of intracellular mycobacteria under high concentration of glucose is independent of inducible nitric synthase expression. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 14~16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 真優子 (Osada-Oka, Mayuko)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 40347498