

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19126

研究課題名(和文) エクソソーム情報伝播を制御する病原性大腸菌分泌因子の解析

研究課題名(英文) The interference of host exosome releases by enteropathogenic Escherichia coli

研究代表者

顔 宏哲 (Yen, Hiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50612066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、感染細胞からナノサイズの膜小胞が放出されることが報告された。この粒子はエクソソームとも知られ、様々な機能性分子を運び、他の細胞の免疫応答を惹起する。腸管病原性、または、出血性大腸菌(EPEC, EHEC)は細胞感染時に積極的に免疫応答を制御することで知られている。私たちは病原菌がエクソソーム機構にも制御しうるかを研究した。その結果、(1)非感染細胞より病原菌感染細胞がより多量のエクソソームを放出する、(2)細胞感染ができないEPEC変異株は放出を促す能力が低下した、(3)EPECからのFactor Aを含む複数の病原性因子がエクソソームの形成に影響する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌と宿主細胞の相互作用の強弱が感染症のアウトカムに繋がることが知られている。その中、エクソソームは細胞間の情報運び屋として働き、感染細胞の炎症情報を伝播する役割を果たしている。本研究を通して初めて腸管病原性大腸菌と腸管出血性大腸菌が積極的にエクソソームの産生に影響する現象を見出し、さらに干渉する病原菌タンパク質を複数同定できた。この事から、エクソソーム機構をうまくコントロールする事が病原菌にとって大切である事を意味する。よって、本研究より同定された病原菌タンパク質の働きとその干渉メカニズムをさらに解析を進む事で、これらを標的とするより良い治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently infected cells were found to release nano-size membranous particles that deliver inflammatory molecules to neighboring cells. As EPEC and EHEC are known to actively interfere host immune responses, we set out to investigate whether EPEC/EHEC could regulate the biogenesis of exosomes. We found that upon challenges of non- or pathogenic Escherichia coli (E. coli), cells released increasing amount of exosomes compared to non-treated cells. Furthermore, pathogenic strains caused much larger releases than that of non-pathogenic strain. Such high releases of exosomes by pathogens-infected cells was attenuated when using a non-infectious mutant strain. To further elucidate potential bacterial molecules capable of regulating exosomes, we identified multiple EPEC virulent factors, including factor A with confirmed ability to influence the generation of exosomes in infected cells.

研究分野：微生物学

キーワード：EPEC Effector T3SS Exosome Immune response infection エクソソーム EHEC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞表面にある Toll-like receptor (TLRs) と細胞質内の Nod-Like receptor (NLRs) は最近の構成成分を認識し下流のシグナル経路群を活性化する。経路の活性化によって炎症サイトカインやケモカインが産生・分泌され、病原菌排除に重要な自然免疫および獲得免疫の活性化を促す。EPEC / EHEC はこのサイトカインとケモカインの産生を積極的に抑制する現象が報告されていた (ref 1)。この現象は病原菌が所有している 3 型分泌装置 (T3SS) に依存し、T3SS を介して細胞内に注入された病原性タンパク質 (effector) が抑制に関与していると推測されている。しかし、詳細なメカニズムは不明であった。我々の研究室は、EPEC / EHEC 感染における TLR 下流の NF- κ B シグナル経路と、NLRs 関連のインフラマソーム / カスパーゼ 1 経路に対する影響を検討した。その結果、EPEC / EHEC は NF- κ B においては NleC および NleE、インフラマソームにおいては NleA という effecor が、それぞれのシグナル経路を抑制している事を明らかにした。

上記の炎症シグナル伝達経路の他に近年、エクソソーム (exosome) と呼ばれる分泌性膜小胞が細胞間の免疫物質の伝播に関わっているという報告がある。エクソソーム はエンドソーム経路の後期に発生する多胞性エンドソーム (Multi-vesicular bodies, MVB) 内で形成され、その過程で輸送物質が内部に積み込まれる。そして、MVB が細胞膜と融合してエクソソームが分泌される。エクソソームは、機能性タンパク質や脂質、核酸など様々なものを運搬しており、これらは取り込まれた細胞で機能することが知られている。実際に Mycobacterium による感染症において、菌に感染したマクロファージが菌の構成分子を含むエクソソームを分泌して、非感染細胞の炎症応答を惹起するという報告がある。このことは、エクソソームが生体免疫反応の一環として機能していることを意味している。EPEC / EHEC は、宿主の免疫応答を制御することが知られており、そのことからエクソソーム経路の制御にも積極的に関与している可能性が考えられる。したがって、本研究では、炎症時に細胞間の機能性物質の伝播に携わっている分泌性膜小胞 (エクソソーム, exosome) に着目し、EPEC/EHEC の感染によるエクソソームの形成と分泌への影響を検討して、そのメカニズムを明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

EPEC/EHEC の感染により、エクソソームの形成および放出が制御される機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞と菌株: ヒト白血病細胞 THP-1 は RPMI (+FCS, +NEAA) 培地で 3 -4 日毎に継代した。培地中に PMA を添加して、THP-1 を貪食様細胞へ分化誘導した。菌株は感染前日に冷凍保存のストックより LB 液体培地に植菌し、30度で一夜振盪培養後、感染実験に使用した。

(2) 感染実験: 一夜振盪培養した菌液の一部を予め 37°C に温めた DMEM 培地 (-FCS) に植え、2時間 37度で振盪培養した。分化した THP-1 は PBS で洗浄後、RPMI (-serum, +NEAA, +LPS) の培地に交換した。交換後、細胞は 37度の CO2 チャンバーで最低 2時間培養を行なった。菌対細胞の数が 10 -20 : 1 の割合になる様、1時間感染させ、その後抗生剤を添加してさらに 3時間培養した。培養液、および、細胞は downstream の実験に応じて適切な回収と処理を行なった。

(3) エクソソーム粒子の分離

培養液中のエクソソームは超遠心法または PEG 沈殿法で分離した。得た粒子のペレットは downstream の実験用途によって PBS または SDS sampler buffer で懸濁した。

(4) ELISA

PEG6000 沈殿法によって得たエクソソーム画分を ELISA プレートに添加し、一晚 4度で反応させた。その後、5% BSA でブロッキングし、一次抗体の抗ヒト CD63 抗体を反応させ、その後、さらに二次抗体反応をさせた。発色には TMB を添加し、室温で 10分反応させたのち、0.1M H2SO4 添加して反応を止めた。変色度は吸光度 450 nm で測定した。

(5) ウェスタンブロットおよび免疫染色

ウェスタンブロットは、細胞抽出液またはエクソソーム画分のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF に転写した。その後、PVDF をブロッキング液で反応させたのち、それぞれ一次抗体ならびに二次抗体を反応させ、ECL/LAS4000 でタンパク質のシグナルを検出した。

免疫染色は、4%PFA で固定した細胞を blocking/permeabilization buffer で前処理したのち、それぞれ一次抗体と対応する二次抗体を反応させた。画像は confocal microscope (オリンパス FV10i) を用いて取得し、Adobe photoshop Creative cloud で後処理を行なった。

4. 研究成果

(1) 腸管病原性大腸菌感染に対する宿主細胞のエクソソーム機構の応答の検討。

エクソソームの分離方法として超遠心法が最も一般的に利用されていることから、初期検討では感染細胞の培養上清中のエクソソームを超遠心法で単離した。量的な変動は、エクソソームマーカーの CD63 を用いてウェスタンブロットにより半定量的に評価した。感染モデル細胞として、免疫細胞の貪食様細胞 THP-1 を使用した。非感染細胞および非病原性大腸菌または腸管病原性大腸菌 (EPEC) に感染させた細胞のエクソソームの放出量を検討したところ、EPEC に感染させた細胞から最も多くの CD63 のシグナルが検出された。さらに、EPEC の感染成立には 3 型分泌装置 (T3SS) が重要な役割を果たすことから、T3SS を欠損した EPEC 菌株を用いて、エクソソームの放出量を比較検討した。具体的には、EPEC 野生株および T3SS 欠損株を感染させた細胞のエクソソーム放出量を、ウェスタンブロットにより CD63 のシグナル強度を比較することで調べた。その結果、T3SS 欠損株を感染させた細胞では、非感染細胞とほぼ同レベルのシグナル強度であったのに対し、野生株を感染させた細胞では顕著に高いシグナルが検出された。このことから、EPEC は T3SS 依存的に宿主細胞の CD63 陽性エクソソームの放出を促している事が考えられた。また、T3SS は病原性因子である effector タンパク質を細胞に注入する機能を有していることから、注入された effector もエクソソーム放出の制御に関わっている可能性が示された。

(2) エクソソーム機構を制御する腸管病原性大腸菌由来の effector タンパク質の検討。

EPEC の effector タンパク質は T3SS によって細胞質内に注入された後、様々な細胞機能を改変することが知られている。数多く存在する effector のうち、エクソソームに関連する経路に影響しうる effector を見いだす目的で、段階的に複数の effector 遺伝子を欠失させていった 7 種類の菌株群 (多重 effector 遺伝子欠失 EPEC 菌株: TOE-A 菌株) を用いて検討した。網羅的かつ定量的に CD63 陽性エクソソームの量を評価するために、エクソソームの分離方法を PEG (ポリエチングリコール) 沈殿法に変更した。その理由として、超遠心法より手順が簡易かつ大量のサンプルを同時に処理できるためである。実際に PEG 沈殿法を用いてそれぞれの細胞からエクソソームを分離し、放出量の比較を行ったところ、上記(1)と同様の結果が得られていることから、PEG 沈殿法の有用性は確認されている。多重 effector 遺伝子欠失菌株 (TOE-A 菌株) を用いたスクリーニング実験において、それぞれの感染細胞から得られたサンプルの CD63 シグナル強度を ELISA で測定し、エクソソーム量として定量した。その結果、エクソソーム量が大きく変化した欠失菌株が複数見出された。このことから、エクソソームの産生または放出の制御には、少なくとも数種類の effector 遺伝子が関与していると考えられた。

(3) Effector タンパク質 A (以降 factor A) によるエクソソーム制御の検討。

複数の候補遺伝子の中から、Factor A による抑制現象の確定を行なった。Factor A 欠失株とその相補株を作成し、それぞれの菌を感染させた THP-1 細胞よりエクソソームを超遠心または PEG 沈殿法で回収した。ウェスタンブロットによる解析の結果、非感染細胞と比べ、Factor A 欠失株を感染させた細胞では、顕著な CD63 陽性エクソソームの放出が検出された。一方で、相補株を感染させた細胞では、欠失株のような顕著な増加は見られなかった。以上より、Factor A はエクソソーム放出を負に制御していることを示唆する。

(4) Factor A による制御メカニズムの検討。

上記(3)の結果を踏まえ、Factor A による細胞内のエクソソーム経路の作用点を検討した。エクソソームの粒子は late endosome の MVB 内の粒子として形成される。通常 MVB は細胞膜と融合してエクソソームを放出するか、もしくは、lysosome と融合して内容物を分解されるかの二通りの運命をたどる。そこで、非感染細胞、Factor A 欠失株およびその相補株をそれぞれ感染させた細胞について、CD63 陽性 MVB の数や CD63 の内包程度を蛍光免疫染色で評価した。その結果、CD63 陽性の MVB の数およびサイズには三者の細胞の間に顕著な差は見られなかった。しかし、CD63 陽性 MVB の蛍光強度については、非感染細胞と相補株を感染させた細胞では同程度であったのに対し、Factor A 欠失株を感染させた細胞では統計的に有意に増加の傾向を示した。このことから、Factor A は CD63 に直接または間接的に作用し、MVB 内の CD63 陽性エクソソームの粒子数を影響する可能性を示唆する。

(5) 研究成果の国内外における位置付けとインパクト、および、今後の展望。

これまで病原菌によるエクソソーム放出の制御については不明な点が多く、本研究を介して初めて腸管病原性大腸菌が感染した免疫細胞のエクソソームの放出を促す事を明らかにする事ができた。また病原菌が持つ様々な病原性タンパク質のなかで、Factor A は CD63 陽性のエクソソームの産生を抑制する可能性を見出した。その阻害機序まで明らかにすることはできなかったが、今後の課題として取り組みたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Ogawa R, Yen H, Kawasaki K, Tobe T. Activation of lpxR gene through enterohaemorrhagic Escherichia coli virulence regulators mediates lipid A modification to attenuate invertebrate immune response. Cell Microbiol. 2018 Jan;20(1). Doi:10.1111/cmi.12806. 査読あり

(2) Urashima A, Sanou A, Yen H, Tobe T. Enterohaemorrhagic Escherichia coli produces outer membrane vesicles as an active defence system against antimicrobial peptide LL-37. Cell Microbiol. 2017 Nov;19(11). Doi:10.1111/cmi.12758. 査読あり

(3) Yen H, Karino M, Tobe T. Modulation of the inflammasome Signaling Pathway by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli. Front Cell Infect Microbiol. 2016 Aug 26;6:89. Doi:10.3389/fcimb.2016.00089. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Innate immune response attenuation by LpxR during enterohemorrhagic Escherichia coli infection. Rikako Ogawa, Hilo Yen, Kiyoshi Kawasaki, Toru Tobe. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月 27 - 29 日. 福岡

(2) NleA of enteropathogenic E. coli interferes ASC-independent inflammasome and suppresses the pyroptotic death. Masaki Karino, Hilo Yen, Toru Tobe. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月 19 - 23 日. 仙台

(3) Hilo Yen, Masaki Karino, Akiko Urashima, Toru Tobe. The Mechanism of EspJ-enhanced Cell Death during the infection of EPEC and EHEC. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23 - 25 日. 大阪

〔その他〕

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~bacteria/>

6 . 研究組織

研究代表者氏名：顔 宏哲

ローマ字氏名：(Yen Hilo)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部保健学科

職名：助教

研究者番号(8桁): 50612066

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。