

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08836

研究課題名(和文) マクロファージ由来細胞外小胞を介した結核菌の休眠維持機構の解明

研究課題名(英文) The growth-down of Mycobacterium tuberculosis by macrophages-derived extracellular vesicles

研究代表者

岡 真優子 (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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：結核肉芽腫内の休眠期結核菌は、無症候状態にある潜在性結核の要因である。結核菌が休眠する機構は不明な点が多く、結核制圧には増殖と休眠の調節機構が重要となる。本研究では、増殖期と休眠期結核菌が感染したマクロファージにhypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) 発現が増大し、HIF-1alphaによるマクロファージ内結核菌の増殖抑制機構を明らかにした。増殖期と休眠期結核菌感染マクロファージの細胞外小胞は、炎症性サイトカイン産生を促した。一方、HIF-1alpha欠損マクロファージの細胞外小胞にはなかったため、HIF-1alphaの新たな役割が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核は、単一病原体による最大級の感染症である。ワクチンや治療薬が開発されているにもかかわらず、年間1000万人が発症するには、休眠期結核菌が持続潜伏感染する無症候状態の患者(潜在性結核)の存在が大きい。そのため、結核菌の増殖と休眠の調節機構の解明は重要である。申請者は、肺結核肉芽腫のマクロファージに発現するHIF-1alphaが増殖期と休眠期の結核菌感染により、さらにこのHIF-1alphaが結核菌の増殖調節や細胞外小胞による炎症性サイトカイン産生に寄与することを明らかにした。HIF-1alphaがマクロファージ内での結核菌に大きな影響を与える新たな因子の1つであることを示す。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are major components of tuberculosis granulomas and are responsible for host defenses against the intracellular pathogen, Mycobacterium tuberculosis (Mtb). We herein showed the strong expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in tuberculosis granulomas and in Mtb-infected mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM). Moreover, HIF-1alpha has a role in a fundamental host-protective mechanism against Mtb. Macrophages are known to produce and secrete exosomes, extracellular vesicles, which are a key factor of inflammation. When both growth phase and latent bacilli were infected in mouse BMDM, both macrophage-derived exosomes enhanced the increase in the pro-inflammatory cytokines. However, the exosomes that were derived from HIF-1 alpha deficient macrophages, did not increase in the level of cytokines. Thus, these results suggest that HIF-1 has a role in the function of exosomes.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 マクロファージ HIF-1alpha 細胞外小胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核の大きな問題の1つには、15億人以上の休眠菌感染者（潜在性結核：無症候状態）の存在がある（WHO, 2014年）。新規結核患者の多くは、初感染より潜在性結核から発症する割合が高い。しかし、結核菌の休眠と増殖の調節機構は不明な点が多く、休眠菌感染者の治療は確立されていない。

潜在性結核患者の肉芽腫病巣には、多くの休眠菌とわずかな増殖期結核菌の存在することが報告されている。しかし、どのように両者の均衡が保たれ結核の発症が抑制されているのか不明である。そこで申請者は、両状態の結核菌が感染するマクロファージ (Mφ) の情報伝達に着目した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞間の情報伝達を担う細胞外小胞（エキソソーム）が、マクロファージ内の休眠菌に及ぼす影響を明らかにする。ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、マクロファージ内で増殖することによって結核を発症し、休眠することによって無症候状態の潜在性結核となる。潜在性結核感染者の肺肉芽腫内には多くの休眠菌とわずかな増殖期結核菌が混在する。しかし、何が？どのように？両者の均衡を維持して結核の発症を抑制しているかは不明である。そこで、申請者は、両状態の菌が生息するマクロファージのエキソソームに着目して結核発症の抑制機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

ウシ型結核菌を低酸素状態で培養して休眠菌を作成した (Wayne LG, et al. 1994 Antimicrob Agents Chemother)。休眠菌は、イソニアジド抵抗性であることを確認した。

マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) は、マウス骨髄から単離した細胞を L929 細胞の培養上清を 20% 含む培地で 7 日間培養して作製した。

増殖期と休眠期結核菌は、菌とマクロファージの細胞数が 10:1 となるように 12 時間感染後、マクロファージに貪食されなかった結核菌を取り除き、感染 0 時間として培養を開始した。マクロファージを界面活性剤で可溶化して 7H11 固形培地に蒔き、菌のコロニーをカウントしてマクロファージ内の生菌数を求めた。また、ルシフェラーゼ発現プラスミドの形質転換株については、可溶化したマクロファージ細胞溶液に基質を添加して、ルシフェラーゼ活性から生菌数を求めた。マクロファージ細胞は、mRNA 発現およびタンパク質発現の解析に使用した。

マクロファージ由来エキソソームは、感染後 12 時間から 72 時間までのマクロファージの培養液を回収し、10,000 x g で 30 分遠心した上清を 0.22 μm のフィルターで濾過し、さらに 100,000 x g で 3 時間超遠心して得られたペレットを PBS に溶解して調製した。エキソソームは、タンパク定量またはリン脂質量により定量した。

マウスマクロファージ (RAW264.7 細胞) およびマウス BMDM の培養液にエキソソーム (ドナー:レシピエント=1:1) を添加し、12 時間または 24 時間培養し、細胞を mRNA 発現およびタンパク質発現の解析に使用した。

mRNA 発現解析は、real-time PCR 法を用いて ΔΔCT 法により解析した。タンパク質発現は Western blotting 法および ELISA 法を用いた。

4. 研究成果

マクロファージの HIF-1α による結核菌の増殖抑制機構

マウス肺結核肉芽腫に hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) の発現することを発見した (Fig. 1)。HIF-1α は、主に低酸素ストレスでの生体防御作用をもつ転写因子で、100 以上の遺伝子を誘導する。この HIF-1α は、増殖期結核菌だけでなく休眠期結核菌の感染したマクロファージに発現し、この発現は Toll-like receptor 2 および 9 により結核菌のもつ糖脂質が認識されることに依存していた。また、HIF-1α 欠損マウスは、野生型マウスに比べて結核菌感染後の生存率が 50% と非常に低かった。マウス BMDM に結核菌を感染した結果、HIF-1α 欠損マクロファージ内での結核菌の増殖は、野生型に比べて促進されており、特に感染初期に HIF-1α の作用が強いことが示唆された。

また、結核菌感染マクロファージの mRNA 発現をマイクロアレイ法により解析した結果、HIF-1α 欠損マクロファージでは野生型に比べて 757 遺伝子が増加し、1190 遺伝子が減少していた。後者の遺伝子は代謝に関連し最も多く分類され、その中でも解糖系酵素が多かった。解糖系酵素の 1 つ乳酸脱水素酵素 (LDH-A) は、肺結核肉芽腫に発現することが報告されていたことから、RAW264.7 細胞由来 *Ldh-a* 欠損マクロファージを CRISPR-CAS9 法で樹立し、結核菌感染による影響を野生型と比較した。野生型に比べて *Ldh-a* 欠損型では菌の増殖が促進された。また、LDH-A がグルコースの代謝物であるピルビン酸を乳酸に分解する作用があることから、ピルビン酸と乳酸量を測定した結果、HIF-1α 欠損型では野生型に比べてピルビン酸濃度が高かった。さらに、必要な炭素源および窒素源を制限した培地では、結核菌の増殖はグルコースよりピルビン酸に依存して促進された。これらの結果から、増殖期の結核菌が感染するマクロファージは、HIF-1α により LDH-A を誘導して結核菌の増殖に重要な炭素源であるピルビン酸を制限することで、結核菌の増殖を低

下させる仕組みをもっていることが示唆された。また、この HIF-1alpha は、休眠期結核菌の感染するマクロファージでも同様に発現することから、HIF-1alpha により休眠状態が維持される可能性が考えられる。

肺肉芽腫のマクロファージは低酸素環境にあり、低酸素が結核菌の休眠誘因となることがよく知られている。本実験では、低酸素培養 (Wayne モデル) による休眠期の作製方法を用いた。増殖期と休眠期の感染するマクロファージを低酸素状態 (5% O₂, 5% CO₂) で培養し、結核菌の HIF-1alpha 発現を解析した結果、酸素存在下 (21% O₂, 5% CO₂) で発現した HIF-1alpha は、低酸素状態では検出されなかった。これらの結果は、肺肉芽腫の HIF-1alpha 発現が、低酸素ではなく結核菌感染によることを示唆している。

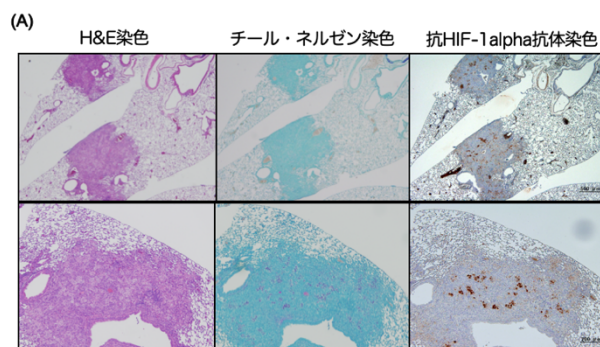


Fig. 1 マウス肺結核肉芽腫およびマウスマクロファージに発現するHIF-1alpha

細胞外小胞によるマクロファージ内の結核菌への作用

マクロファージに増殖期または休眠期結核菌感染後、その培養上清からエキソソームを精製した。非感染と比較し、分泌量はわずかに増大したが、エキソソームの非感染マクロファージでの炎症性サイトカイン誘導作用はなかった。また、72 時間培養後のマクロファージ由来エキソソームに内包されるタンパク質に大きな差は無かった。しかしながら、HIF-1alpha 欠損マクロファージのエキソソームは炎症性サイトカインを誘導しなかった。

次に、増殖期結核菌感染マクロファージ由来エキソソームを休眠期結核菌感染マクロファージに作用させた。72 時間までマクロファージに発現する炎症性サイトカイン (TNFalpha) および誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) ならびに HIF-1alpha の発現変化を経時的に調べた。TNFalpha は、休眠期結核菌感染により増大したが、エキソソームによる発現の変化はなかった。一方、休眠期結核菌感染で増大した iNOS および HIF-1alpha の発現は、エキソソームにより増加傾向を示した。また、休眠期結核菌感染マクロファージ由来エキソソームを増殖期結核菌感染マクロファージに作用させた結果、エキソソームによる iNOS と HIF-1alpha 発現の増大はみられなかった。以上の結果より、増殖期結核菌感染マクロファージは、エキソソームを介して休眠期結核菌感染マクロファージにシグナル伝達をする可能性が示唆された。

休眠期結核菌をマクロファージに感染させることで、結核菌の細胞内休眠モデルの作製を試みた。しかし、ウシ型結核菌はヒト型結核菌に比べて弱毒性であり、72 時間の培養後は多くがマクロファージにより消化されていた。そのため、72 時間感染後のエキソソームに増殖期と休眠期で大きな差が無かったと考える。しかしながら、増殖期結核菌を感染させたマクロファージのエキソソームでは細胞間相互作用を捉えることができた。

考察

マクロファージは細胞内寄生菌である結核菌の住処であり、結核菌はマクロファージと共存しながら休眠を続ける。リウマチ治療薬の抗 TNFalpha 薬が休眠期から増殖期へ誘導することから、マクロファージの TNFalpha 産生は結核菌の休眠を維持するために重要な炎症性サイトカインである。一方、NO や低酸素は増殖期から休眠期へ誘導する因子であるため、iNOS の発現は結核菌の増殖を抑制する因子となる。本研究では、転写因子 HIF-1alpha による結核菌増殖を抑制する新たな機構を明らかにした。HIF-1alpha により発現制御される乳酸脱水素酵素は、結核菌のエネルギー産生に重要な炭素源のピルビン酸を乳酸へと分解することで炭素源を制限していた。また、HIF-1alpha による iNOS 発現の増大も菌の増殖抑制に寄与していた。さらに、増殖期結核菌の感染するマクロファージ由来エキソソームがマクロファージ間の情報伝達物質として iNOS および HIF-1alpha 発現に寄与しており、エキソソームは結核菌の休眠への誘導因子の一つとなっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Manabu, Niki Mamiko, Ozeki Yuriko, Nagi Sachio, Chadeka Evans Asena, Yamaguchi Takehiro, Osada-Oka Mayuko, Ono Kenji, Oda Tetsuya, Mwende Faith, Kaneko Yukihiko, Matsumoto Makoto, Kaneko Satoshi, Ichinose Yoshio, Njenga Sammy M., Hamano Shinjiro, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor alpha production by mycobacteria-infected human macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24233-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Maekura Ryoji, Kitada Seigo, Osada Oka Mayuko, Tateishi Yoshitaka, Ozeki Yuriko, Fujicawa Takeya, Miki Mari, Jyunko Ogawa, Mori Masahide, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 130 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Y, Oe T, Kawakami K, Osada-Oka M, Ozeki Y, Terahara K, Yasuda I, Edwards T, Tanaka T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumoto S, Ariyoshi K	4. 巻 10
2. 論文標題 CD4(+) T Responses Other Than Th1 Type Are Preferentially Induced by Latency-Associated Antigens in the State of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 2807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osada-Oka M, Goda N, Saiga H, Yamamoto M, Takeda K, Ozeki Y, Yamaguchi T, Soga T, Tateishi Y, Miura K, Okuzaki D, Kobayashi K, Matsumoto S	4. 巻 31
2. 論文標題 Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for Mycobacterium tuberculosis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 781-793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡 真優子, 今宮 里沙, 矢倉 大介, 木村 唯, 堀口 安彦, 市川 寛, 南山 幸子
2. 発表標題 大腸菌外膜由来細胞外小胞によるエキソソームを介した炎症因子誘導作用
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会 第18回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今宮 里沙, 岡 真優子, 矢倉 大介, 堀口 安彦, 市川 寛, 南山 幸子
2. 発表標題 大腸菌タンパク質によるエキソソームを介した炎症因子誘導作用
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会 第18回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡 真優子
2. 発表標題 細菌と宿主細胞の異種細胞間での細胞外小胞を介した相互作用と炎症機構
3. 学会等名 第12回腸内細菌をターゲットとした食品開発研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayuko Osada-Oka, Mutsumi Sato, Yuriko Ozeki, Sohkichiro Matsumoto
2. 発表標題 The role of HIF-1 -regulated genes in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages
3. 学会等名 The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayuko Osada-Oka, Risa Imamiya, Yui Kimura, Daisuke Yakura, Hiroshi Ichikawa, Yukiko Minamiyama, Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 The extracellular vesicles from E. coli and macrophages mediate the inflammatory responses
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 真優子, 今宮里沙, 小林慧子, 堀口安彦, 市川 寛, 南山幸子
2. 発表標題 マクロファージのエキソソームを介した大腸菌感染によるNO産生機構
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 真優子、松本壮吉
2. 発表標題 結核菌の増殖を制限するマクロファージの戦略
3. 学会等名 第13回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayuko Osada-Oka, Yuriko Ozeki, Takahiro Yamaguchi, Sohkiichi Matsumoto
2. 発表標題 Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for M. tuberculosis
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayuko Osada-Oka, Yuriko Ozeki, Sohkichi Matsumoto
2. 発表標題 Metabolic Adaptation to Glycolysis by HIF-1 Is a Basic Defense Mechanism of Macrophages for Mycobacterium tuberculosis Infection
3. 学会等名 The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 54th Mycobacteria Panel Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀口 安彦 (Horiguchi Yasuhiko) (00183939)	大阪大学・微生物病研究所・教授 (14401)	