

令和元年5月29日現在

機関番号：13301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K15449
研究課題名(和文)細菌感染におけるエクソソームの生理機能の解明

研究課題名(英文)Function of exosomes in bacterial infection

研究代表者

吉田 孟史 (YOSHIDA, Takeshi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：60635100

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)：本研究では、細菌感染における細胞が分泌するナノサイズの小胞エクソソームの機能解明を目的に研究を行った。炎症初期では好中球が大量のエクソソームを分泌し、多くはマクロファージに取込まれ、組織傷害を緩和することを明らかにした。さらにエクソソーム中の熱ショックタンパク質の一部にマクロファージで炎症シグナルを活性化する機能があることを明らかにした。がんにおける好中球エクソソームの有効性を検証し、エクソソームがマクロファージのがん細胞貪食能を亢進し、抗腫瘍効果を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症における細胞外小胞の機能は依然として未解明な部分が多い。本研究では、細胞外小胞が免疫応答を活性化することで細菌の除去につながることを分子レベルで解明しており、細胞外小胞の機能の理解を深めることにつながった。さらに、この免疫応答が感染症だけでなく腫瘍に対しても有効であることを示した。本研究で得られた知見は、感染症やがんに対する新たな作用機序をもつ薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we had studied about functions of nano-sized vesicles including exosomes secreted from immune cells in bacterial infection. In the early stage of inflammation, we found that exosomes were secreted from neutrophils, were up taken by macrophages and decreased tissue injury. Furthermore, we revealed that some kinds of heat shock proteins in the exosomes have a function to induce inflammatory signals in macrophages. As a result from an anti-tumor study of the neutrophil exosomes, it was revealed that the exosomes enhance the phagocytosis activity of cancer cells in macrophages and caused the anti-tumor effect.

研究分野：免疫学

キーワード：エクソソーム 炎症 マクロファージ

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

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは分泌細胞由来の蛋白質や RNA 等を内包する 30-100 nm の分泌膜小胞で、新たな細胞間の情報伝達機構として注目されている。免疫系は多様な細胞がコミュニケーションをとることで細菌などから身を守っており、多くの種類の免疫細胞がエクソソームを分泌するが、その生理的機能はほとんど明らかとなっていない。私達は、エクソソームの受容体である Tim4 がマクロファージに特異的に高発現していることから、エクソソームがマクロファージの機能制御に関与していると考え、自然免疫応答におけるエクソソームの機能を解析した。大腸菌などの細菌をマウス腹腔内に投与すると、強い炎症応答が惹起され、肝組織等の破壊により血中 AST・ALT 値が急激に上昇する。同様に IL-1 β ・IL-6・TNF- α などの炎症性サイトカイン値の上昇も生じる。細菌感染時には好中球などの免疫細胞が感染部位に滲出するが、これらの滲出細胞由来のエクソソームをあらかじめ回収して濃縮し、大腸菌投与後 3 時間後に投与したところ、エクソソームの投与量依存的に血中 AST・ALT や炎症性サイトカイン値が顕著に減少することが判明した (図 1A)。更にこの現象は、エクソソームが腹腔内マクロファージを活性化し、細菌を速やかに除去した為に生じることが明らかとなった (図 1B) この知見を基に本研究では、好中球由来エクソソームがマクロファージを活性化する分子機序を明らかにすることを目的とする。

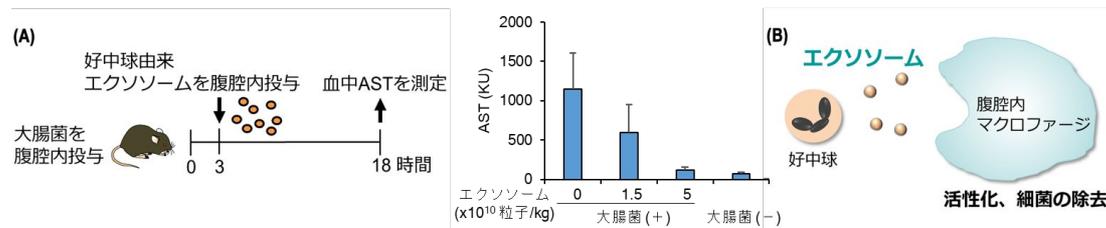


図 1. 好中球由来エクソソームによる生体防御機構

2. 研究の目的

様々な細胞が分泌する膜小胞エクソソームは細胞間の新たな情報伝達物質として近年注目されている。エクソソーム上には多くの免疫関連分子が存在しているが、エクソソームを介した免疫制御機構は不明な点が非常に多い。これまで私達は、炎症時に誘導される好中球から分泌されるエクソソームの機能解析を行い、このエクソソームが炎症部位に存在するマクロファージの活性化を促進することを見出した。そこで本研究では、エクソソームを介したマクロファージ活性化の分子基盤を明らかにすることを目的とする。本研究の成果により、エクソソームを介した自然免疫応答の制御機構が明らかとなり、感染症や敗血症などに対する新たな治療標的の発見につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) 細菌感染マウス実験

C57BL/6 マウス 10 週齢に *E. coli* 死菌 500 mg/kg を腹腔内投与した。任意の時間に腹腔に PBS を投与し細胞・エクソソームを回収した。好中球エクソソーム投与実験は、感染 3 時間後に記載量のエクソソームを腹腔投与し、感染 18 時間後に血清 AST 値を測定した。

(2) エクソソーム精製

C57BL/6 マウス 10 週齢に *E. coli* 死菌 500 mg/kg または 3%チオグリコレート 100 mL/kg を腹腔内投与した。好中球由来エクソソームは投与 12 時間後に、マクロファージ由来エクソソームは投与 3 日後に、腹腔から回収した。遠心により細胞および細胞断片を除去したのちに、MagCapture Exosome Isolation Kit (Wako) を用いてエクソソームを精製した。

(3) *in vitro* エクソソーム機能解析 RAW264.7 細胞にエクソソームを任意の量で添加し、pHrodo-*E. coli* (Thermo) を用いた細菌貪食能の評価あるいは ELISA 法によるサイトカイン分泌量の定量をおこなった。また、細胞抽出液は NF- κ B 関連分子に対する各抗体を用いてウェスタンブロット法で解析した。

(4) *in vivo* 細菌貪食評価系

C57BL/6 マウス 10 週齢にエクソソームおよび pHrodo-*E. coli* を腹腔内投与した。投与 6 時間後に腹腔から細胞を回収し、APC-anti-mouse F4/80 抗体で染色した後に flow cytometer を用いて pHrodo 陽性マクロファージの数を測定した。

(5) *in vitro* がん細胞貪食実験 RAW264.7 細胞を 4 x 10¹⁰ particles/ml のエクソソームで活性化した。PKH 標識したがん細胞 B16F10 細胞又は FM3A 細胞をエクソソーム刺激した RAW264.7 細胞に添加した。3-6 時間後に細胞を PBS で洗浄し蛍光顕微鏡または flow cytometer を用いて PKH 標識がん細胞の貪食を測定した。

(6) マウス抗腫瘍実験 C57BL/6 マウス 10 週齢に B16F10 細胞を皮下移植した。移植後 7、10、13、16 日にエクソソームを 5 x 10¹¹ particles/kg で腫瘍内投与し、腫瘍体積を測定した。

4. 研究成果

(1) 好中球由来エクソソームはマクロファージの貪食能を活性化させる

私達はこれまでの研究から細菌感染において好中球が分泌するエクソソームがマクロファージに取込まれ、マクロファージを活性化することにより細菌を除去することを明らかにした。この機能が好中球由来エクソソームに特有の機能であるかを調べるために、細菌感染3日後に誘導されるマクロファージが分泌するエクソソームを回収し、その機能を評価した。細菌感染3時間後のマウスに好中球由来エクソソーム (Neu-exo) を投与すると炎症マーカーAST は、PBS投与マウスに比べ大きく低下する。一方で、マクロファージ由来エクソソーム (Mφ-exo) を投与したマウスでは AST 値の抑制は見られなかった(図2A)。*in vivo*細菌貪食評価実験でも同様に、好中球由来エクソソームはマクロファージの貪食能を亢進させたのに対し、マクロファージ由来エクソソームは貪食能を変化させなかった(図2B)。これらの結果は、マクロファージを活性化させる能力は好中球由来エクソソームに特有の能力であることが示唆された。

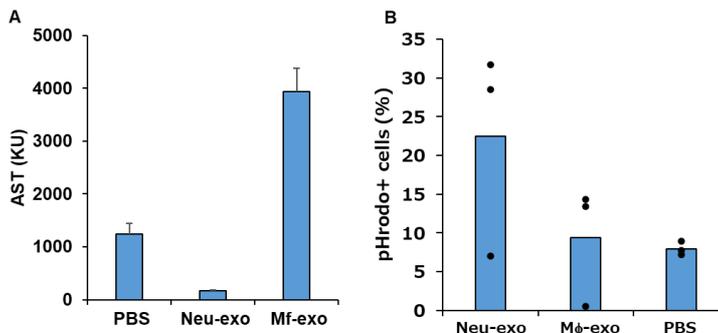


図2. 細菌感染におけるエクソソームの作用

(2) エクソソーム中の熱ショックタンパク質がマクロファージを活性化する

好中球由来エクソソームのどの成分がマクロファージを活性化するのかを明らかにするために、エクソソーム中のタンパク質成分の網羅的解析を試みた。これまでに、大腸菌誘導好中球由来エクソソームとチオグリコレート誘導好中球由来エクソソームが共にマクロファージ活性化能をもつことを見出している。そこで、活性をもつ2種類の好中球由来エクソソームと活性をもたないマクロファージ由来エクソソームを単離精製し、質量分析法を用いてタンパク質成分の比較解析を行った。その結果、2種類の好中球由来エクソソームに共通でマクロファージ由来エクソソームに含まれないタンパク質36種類(熱ショックタンパク質ファミリー、アディポネクチン、血液凝固関連タンパク質群、補体タンパク質群など)を同定した。一方で、マクロファージ由来エクソソームに特異的なタンパク質47種類(アネキシンファミリー、アポリポタンパク質、インテグリンファミリーなど)も同定した(図3A)。次に、好中球由来エクソソーム特異的なタンパク質のうち一部を候補タンパク質として選定し、HEK 293T細胞に過剰発現させその培養上清から精製したエクソソームを細菌貪食 *in vitro* 評価系を用いて評価した。その結果、一部の熱ショックタンパク質が細菌貪食能を亢進させることを明らかにした(図3B)。また、これら熱ショックタンパク質は炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6 の分泌を促進し、複数の貪食受容体の発現を誘導することも明らかとなった(図3C)。

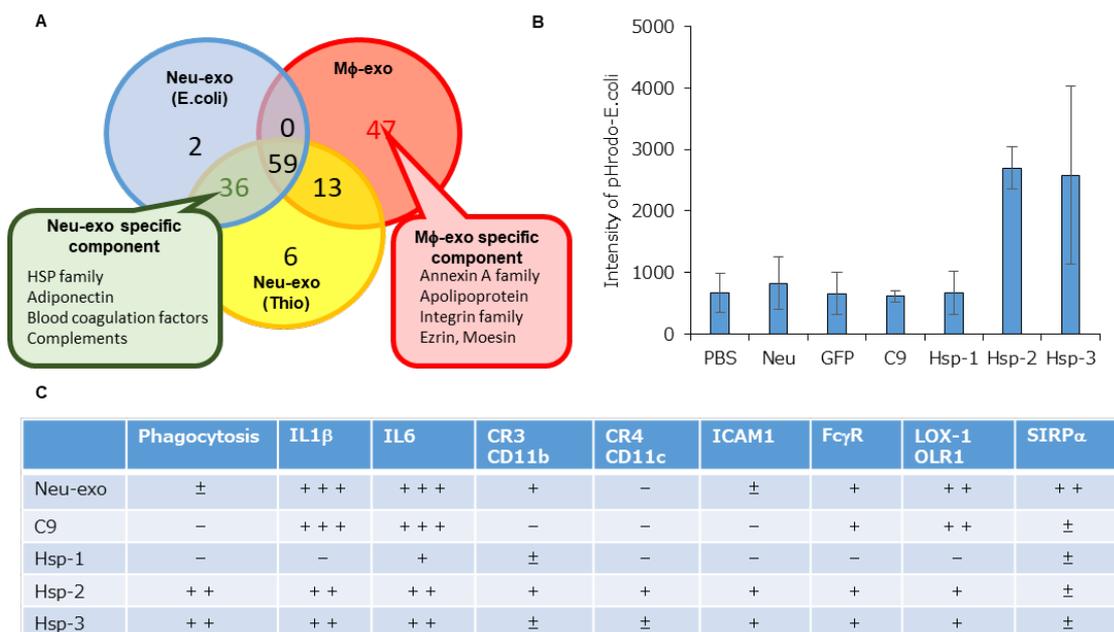


図3. エクソソームタンパク質成分の解析とその機能

(3) エクソソームは NF- κ B 経路によりマクロファージを活性化する
 好中球由来エクソソームがマクロファージにどのような作用を及ぼすのかを明らかにするために、エクソソーム刺激したマクロファージのトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析の結果から、NF- κ B シグナル関連分子の発現上昇が認められ (data not shown)、エクソソーム刺激によりマクロファージが活性化する可能性が示唆された。実際に好中球由来エクソソームで刺激したマクロファージでは強い E. coli 貪食能の亢進、炎症性サイトカイン IL-6、TNF- α の分泌量増加が見られ (図 4 A, B)、NF- κ B 関連タンパク質の活性化が確認できた (図 4 C)。これらの結果から、好中球由来エクソソームがマクロファージの NF- κ B シグナルを活性化することで、炎症性サイトカインの分泌、細菌貪食能の亢進を引き起こし、細菌を積極的に除去していることが考えられる。

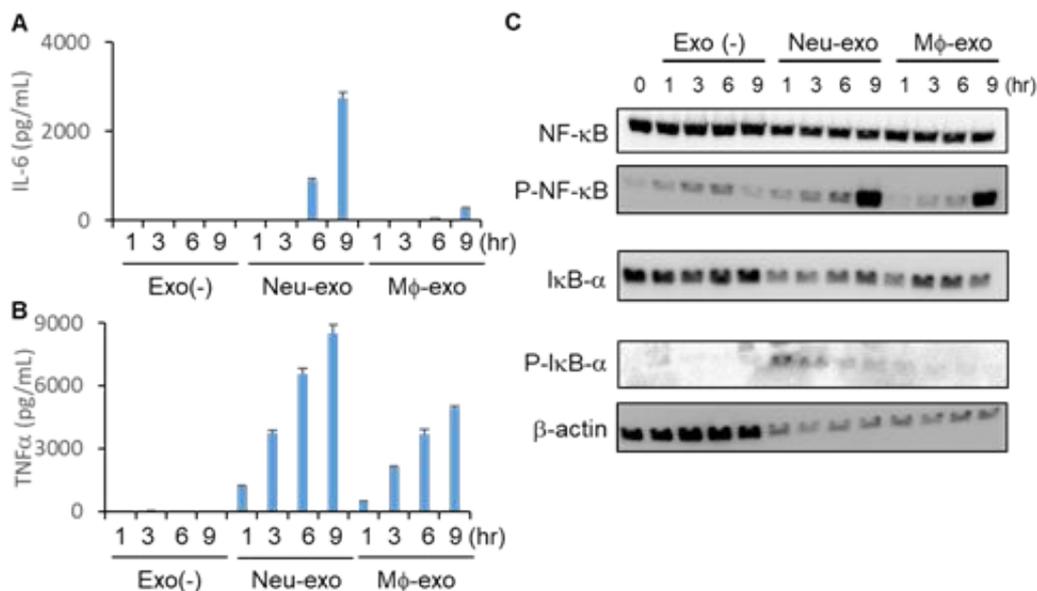


図 4 . エクソソームによる NF- κ B 経路の活性化

(4) 好中球由来エクソソームは抗腫瘍効果を誘導する

最後に、好中球由来エクソソームで活性化したマクロファージが生細胞であるがん細胞を貪食可能であるかを検討した。マウスメラノーマ B16F10 細胞あるいはマウス乳がん由来細胞 FM3A 細胞に対する貪食が好中球由来エクソソームの刺激で亢進するのかを *in vitro* がん細胞貪食実験で評価した。マクロファージを好中球エクソソーム刺激で刺激することでがん細胞に対する貪食能が亢進した (図 5 A)。FM3A に対する貪食作用実験では、CpG DNA + interferon- γ + IL-10 receptor 抗体による刺激 (PC) と同等の効果が好中球由来エクソソームによって得られた。B16F10 細胞の担がんマウス実験でも、好中球由来エクソソームを 3 日毎に腫瘍内投与することで腫瘍成長が約 30%抑制された (図 5 B)。以上の様に、好中球由来エクソソームは細菌感染だけでなく、がんに対しても効果を示すことが明らかとなった。

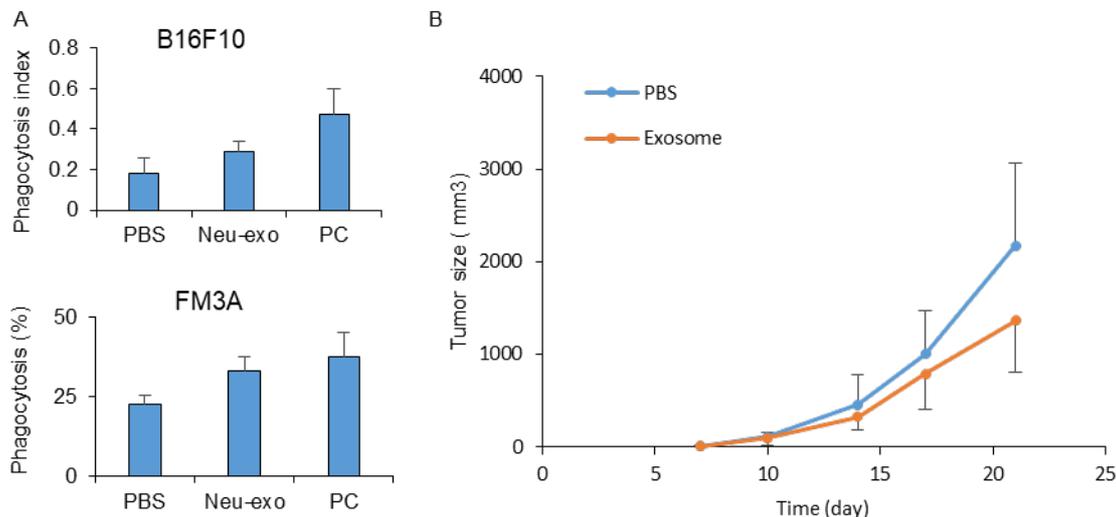


図 5 . エクソソームの抗腫瘍活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

High Purity Isolation and Sensitive Quantification of Extracellular Vesicles Using Affinity to TIM4. Yoshida T, Ishidome T, Hanayama R, Current protocols in cell biology 77 3.45.1-3.45.18 2017年12月 [査読有り] DOI: 10.1002/cpcb.32

Induction of Live Cell Phagocytosis by a Specific Combination of Inflammatory Stimuli. Ishidome T, Yoshida T, Hanayama R EBioMedicine 22 89-99 2017年8月 [査読有り] DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.07.011

〔学会発表〕(計 5 件)

Nguyen Duc Tuan、相羽久輝、吉田孟史、土屋弘行、華山力成、Extracellular vesicles released from osteosarcoma alter bone microenvironment、日本薬学会北陸支部第130回例会、2018年11月、富山

吉田孟史、馬雲飛、Duc Tuan Nguyen、華山力成、Tumor cells discharge anti-tumor drugs via exosomal pathway、第91回日本生化学会大会、2018年9月、京都

馬雲飛、吉田孟史、Duc Tuan Nguyen、華山力成、Tim4を用いたエクソソームの高純度単離と高感度定量法、第91回日本生化学会大会、2018年9月、京都

Duc Tuan Nguyen、Hisaki Aiba、Takeshi Yoshida、Hiroyuki Tsuchiya、Rikinari Hanayama、Alteration of bone microenvironment by extracellular vesicles released from osteosarcoma、第91回日本生化学会大会、2018年9月、京都

吉田孟史、馬雲飛、竹中雄輝、榎本真大、華山力成、エクソソームによる抗がん剤の排出機構、Discharge of anti-tumor drug via exosomes、第4回日本細胞外小胞学会、2017年8月、広島

〔図書〕(計 3 件)

相羽久輝、吉田孟史 他、骨とエクソソーム、臨床整形外科、医学書院、2018年12月、1122-1126

吉田孟史、華山力成、エクソソームによるマクロファージの制御、炎症と免疫、先端医学社、2018年7月、286-291

吉田孟史、華山力成、エクソソームの高純度精製法と生理機能解析マウス、生体の化学、医学書院、2018年2月、77-82

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://immunology.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Diego Diez

ローマ字氏名:(Diego, Diez)

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。