

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07538

研究課題名(和文) Exosomeを介して伝播する腸管出血性大腸菌effectorの特定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of EHEC virulent factors in exosome and its functional role during the infection

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究より、EPECの感染細胞から多くのエクソソームが放出される現象を見出した。エクソソームは細胞間の物質輸送に関わる粒子として知られているが、この大量放出された粒子はEPEC感染過程においてどのような役割を果たしているかは不明である。本研究を介して、感染によるエクソソームの大量放出は T3SS 依存的な現象であることがわかった。そして、感染細胞のCaspase-4 の活性化を阻害することで、エクソソームの放出量が抑制できる。最後に、感染細胞由来のエクソソームに、病原菌由来の毒素タンパク質が存在することを出し、この毒素は他細胞に伝播したのち、病原菌の付着率を高める効果があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EPEC はこれまでに直接感染した細胞に毒素を打ち込むことで、細胞の機能を制御することが知られている。本研究を介して、打ち込まれた毒素はエクソソームを介して他細胞に伝播し、その細胞に対する菌の接着率を高める効果がある事を初めて示した。EPEC感染を理解する上で、新しい見解を提供できるものである。さらに、感染細胞由来のエクソソームは感染の進行に正の働きをする事から、EPEC感染症の新規治療薬として、エクソソームは一つの標的になりうる可能性を示したことに意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) use its Type 3 secretion system (T3SS) to deliver virulent factors inside host cells. In a previous study, we have observed that EPEC infection induced a significant amount of exosome from the host cells. Recently, exosomes have been implicated in intracellular transmission of functional molecules. However, how these exosomes contributed to the progression of EPEC infection is unknown. In current study, we found that the induction of exosome is dependent on the T3SS and that pharmacological inhibition of Caspase-4 could block T3SS-dependent induction of exosome. Lastly, we found a T3SS-associated virulent protein in exosomes. Functional studies showed that administration of these exosomes to non-infected cells allowed a higher attachment rate of EHEC compared to non-administrated cells. In all, current investigation showed the first time that EPEC induced exosome carrying a specific virulent factor to enhance secondary infection.

研究分野：細菌学

キーワード：EPEC inflammation exosome effector T3SS

1. 研究開始当初の背景

Exosome と呼ばれる分泌性膜小胞は、endosome 経路の後期に発生する多泡性 endosome (Multivesicular bodies, MVB) 内で形成され、その過程で輸送物質が積み込まれる。そして、MVB が細胞膜と融合したのち、exosome が分泌される。輸送された物質は 相手細胞内で働くことが報告がある。感染症において、Mycobacterium に感染されたマクロファージは、菌の構成分子を含む exosome を分泌して、非感染細胞の炎症応答を惹起する。また、細胞に取り込まれた志賀毒素の一部も exosome によってさらに他処へ伝播するという報告がある。現在、特定の病原分子が exosome へと積み込む機序は定かではないが、exosome は生体免疫反応に関わり同時に、病原菌はこの機能を利用することで感染の成立を助長している可能性が示唆される。

先行研究より、感染時の exosome は炎症物質を輸送することから、EHEC および EPEC は exosome 分泌を負に制御する仮説を立て、検討を行った。予想を反し、野生株は T3SS 欠損株より多くの exosome 産生を促し、T3SS 依存的な現象であった。EHEC/EPEC は積極的に免疫を抑制する機構を複数持っているにもかかわらず、exosome に関しては惹起する方向に働いている。一見感染の成立には不利に思われるこの現象であるが、EHEC/EPEC は T3SS によって細胞質に注入した effector を、exosome 分泌によって伝播に利用し、非感染細胞の免疫応答から始めとする細胞機能を制御すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) と腸管病原性大腸菌 (EPEC) の感染には 3 型分泌装置 (T3SS) と呼ばれる針様のタンパク質複合体が必要である。この装置によって病原性タンパク質 effector が細胞質内に注入され、感染細胞の様々な細胞機能を調節する。その一つが宿主の免疫応答の抑制である。一方、炎症時に細胞は exosome と呼ばれる分泌性膜小胞を介し、炎症性物質を伝播するが、EHEC/EPEC は T3SS に依存してその分泌を亢進することを先行研究で見出した。しかし、この現象が病原菌の感染過程においてどのような生理的意義を持つのかについては定かではない。申請者は、病原菌は exosome を利用し、effector を周囲細胞に拡散することで、さらなる感染の成立に寄与しているのではないかと考えている。したがって、本研究は感染細胞より分泌される exosome に effector が含まれているかを確認し、その effector の種類と感染に対する役割を明らかにすることを目的としている

3. 研究の方法

(1) 細胞および菌の培養

Caco-2 細胞は MEM (10% FCS, 1x NEAA, 1x Pyruvate acid) で維持した。THP-1 または HT29 細胞は RPMI (10% FCS, 1x NEAA, 1x Pyruvate acid, 1x Penicillin/Streptomycin) で維持した。貪食様細胞に分化には、THP-1 細胞に PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 100 ng/ml 最終濃度を添加し、6 日間培養した。6 日目に PMA を含まない培地に置き換え、さらに 1 日培養し、7 日目の細胞を感染実験に用いた。

使用する大腸菌は LB 液体培地(場合によって適切な抗生物質添加済み)で 30 °C 一夜振動培養した。

感染実験にあたり、大腸菌は無血清の DMEM 培地に植え替え、さらに 37 度で 2 時間振動培養して、細胞の感染に用いる。

(2) Exosome の分離

培養細胞の培地を回収後、遠心して細胞および細菌を除去した。さらに直径 200 nm 以上の粒子を除くために、遠心して得た上澄を直径 0.2 μm pore size のシリンジフィルターにかけた。濾過した液を実験によって、超遠心、PEG 沈殿、Amicon (100kDa cut-off)法で exosome を濃縮した。

(3) Western blotting

濃縮された exosome および細胞に対して、1x RIPA buffer (+1x Protease inhibitor cocktails) で溶解し、同一 volume の抽出液を SDS-PAGE で展開し、western

blotting を行った。Exosome マーカーは anti-CD63、anti-Flotillin-2 anti-Syntenin-1 を使用した。非 exosome マーカーとして、anti-Calnexin を使用した。細胞抽出液の Loading control は anti-Actin または anti-Tubulin で行った。

(4) ELISA

ELISA の Capture は Heparin、そして検出は anti-CD63 抗体の組み合わせで行った。PEG 沈殿方で得た濃縮 Exosome サンプルを一定量で各 well に添加し、一夜 4 度で培養する。翌日、ELISA plate を PBS で洗浄し、5% BSA/PBS で 37°C 1 時間 blocking を行ったのち、一次抗体の anti-CD63 抗体、二次抗体 Goat anti-mouse-IgG-HRP の順で prob した。最後に高感度の TMB 基質液を添加し室温で 10 分発色後、stop 液添加し、色調の変化を Plate reader で読み込んだ。

(5) EHEC 接着率実験

100% confluent した Caco2 または HT29 細胞に対して、一定量の濃縮 exosome を細胞に投与し、一夜培養した。翌日、DMEM 培地で 2 時間 37°C 培養した EHEC を moi 100 なるように細胞に加え、90 分感染させた。その後、細胞を 1x PBS で複数回丁寧に洗浄し、付着していない EHEC を除いた。洗浄された細胞を 1% Triton-X/PBS で溶解し、1000g で遠心した。上澄を PBS で 10 倍希釈系列を作成した。そのうち、1000 倍希釈した上澄 100 μ l 分を LB agar plate に植え、37 度一夜培養した。翌日 plate に生えたコロニー数をカウントし、CFU/ml を算出した。

4. 研究成果

(1) EPEC T3SS 依存的に Exosome 量の増大

非病原大腸菌 (SE11 株) と腸管病原性大腸菌 (EPEC, E2348/69 株) に曝露した細胞の exosome 産生量を WB で半定量的手法で評価した。非曝露細胞と曝露細胞の培地上清中の exosome 粒子を超速心で濃縮したのち、RIPA バッファーでタンパク質を抽出した。同一 volume の lysates を SDS-PAGE で分離し、anti-Flotillin-2 抗体で検出した。同細胞量を示す loading control として全細胞抽出液中の Actin で検出した。結果 (図 1)、Flotillin-2 陽性 exosome は非感染細胞では検出レベル以下に対して、SE11 株および EPEC 曝露細胞からの exosome 量は増加した。そのうち、EPEC 曝露細胞が一番顕著に増えていることがわかった。

次に、EPEC E2348/69 の感染に T3SS は非常に大きな役割を果たしていることから、観察された増加は T3SS 依存的な現象なのかを調べた。野生株 (WT) と *escF* (T3SS 欠失株) を用いて、非感染細胞およびそれぞれの菌株の感染細胞由来の exosome を培地上清より濃縮した。その後 WB を行った。結果 (図 2)、野生株感染細胞より多くの Flotillin-2 タンパク質が検出されたに介して、*escF* 感染細胞は同程度のタンパク質量を検出できなかった。同様に CD63 や Syntenin-1 といった exosome マーカーでも類似の傾向を示した。これによって、EPEC 野生株感染によって宿主細胞から多くの exosome が放出される事は、T3SS 依存的な現象であることを示した。

(2) 感染細胞の活性化 Caspase-4 は exosome 放出量を影響している

Exosome の放出量の調節機構は未だ不明な所が多い。他グループより、免疫細胞の樹状細胞の MHCII 陽性 exosome はインフラマソーム関連因子の NLRP3/ASC に依存していると報告されている。今回使用した貪食様細胞の THP-1 も機能している NLRP3/ASC インフラマソームを有しているため、EPEC 感染による exosome 放出の増大は NLRP3 に依存しているかを調べた。NleA は EPEC/EHEC 共通の effector であり、過去にこの effector は直接 NLRP3 阻害する事を申請者は報告していた。そこで、EPEC WT に *NleA* 多コピー発現するプラスミドを導入し、それぞれ野生株 (WT or WT/vector) と *NleA* 過剰発現株 (WT/pNleA) を用いて THP-1 細胞を感染し、細胞由来の exosome を ELISA 法で定量した。結果 (図 3)、WT/pNleA 感染細胞から一番多くの CD63 陽性 exosome が検出された。このことから、*NleA* は exosome の分泌に対して正の影響をしていることと、それは NLRP3 阻害による効果ではないことを示した。さらに、NLRP3 に対する特異的阻害剤 MC-950 でも検証した。結果 (図 4)、感染細胞に MC-950 を投与しても、未投与のときと比べて CD63 陽性 exosome の量的変化は見られなかった。

次に、他のインフラマソーム経路に関わる分子を検討したうち、Caspase-4 に着目した。Caspase-4 は LPS の細胞内 receptor としても働き、また非古典的 NLRP3 インフラマソーム経路に置いて重要な役割を果たしている。EPEC 野生株感染によって、Caspase-4 の活性化を検討した。結果 (図 5)、培養の上澄中の Caspase-4 の量は非感染細胞と比べて感染細胞の活性化中間体が多くみられた。さらに、この中間体の発生量は Caspase-4 阻害剤 Z-LEVD-fmk (10 μ) 存在下では減少していた。Caspase-4 の活性化具合と培地中の exosome の量の相関性を検証した。結果 (図 6)、Z-LEVD-fmk で前処理した感染細胞からの CD63 陽性 exosome の量は、未投与のグループより低い事が明らかとなった。このことから、EPEC 感染によって活性化された Caspase-4 は 直接または間接的に exosome の分泌量と関係している可能性がある。

(3) 病原性タンパク質 X は exosome 分画に存在し、細菌の接着亢進に寄与する

EPEC 感染細胞は多量の exosome を放出することが明らかとなったが、病原性細菌の感染成立にどのように寄与しているかを検討した。そこで、exosome のレシピアント細胞に対する感染率の変化を調べた。それぞれ非感染細胞と感染細胞由来の exosome (EV_{UI} と EV_{infection}) を Caco-2 または HT29 腸管上皮細胞株に投与し、EHEC を用いて感染実験を行った。EHEC は EPEC と比べて感染効率が相対的に低く、exosome による感染効率の変化があった場合、その違いが観察しやすい可能性があるため利用した。結果 (図 7)、Mock または EV_{UI} の細胞に対して、EV_{infection} 投じた細胞に対する EHEC 付着率は増進した。

より多くの EHEC が細胞に接着することができることで、感染率も高められたと考えられる。そこで、EPEC/EHEC で接着に関与する分子が exosome 分画に存在するかを精査した。結果 (図 8a)、virulent factor X が検出された。Exosome の放出は GW4869 阻害剤によって抑制されることが知られている。そこで、Factor X は exosome と伴い細胞外に放出されたのか GW4869 有無で細胞外 Factor X の量に影響するかを調べた。結果 (図 8b)、感染細胞由来の exosome 中の Factor X は阻害剤存在下で検出レベル以下になった。このことから、Factor X は exosome と共に放出された可能性を示唆した。

図 1 腸管病原性大腸菌は多量の exosome 放出を促す

非感染 (UI) または感染細胞 (非病原性大腸菌 SE11、病原性大腸菌 EPEC 野生株) の培養上清中の exosome を超遠心で濃縮し、Flotillin-2 を WB で検出した (EV)。同一細胞量のコントロールとして細胞抽出液 (WCL) 中の β -Actin 量を調べた。

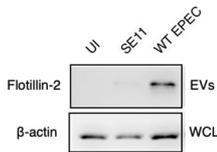


図 2 EPEC 感染細胞の多量 exosome 放出は T3SS 依存的現象である。

非感染 (UI) または EPEC 感染細胞 (WT: 野生株、escF: T3SS 欠損株) から放出された exosome 量を WB で解析した。使用した exosome マーカーは CD63 と Syntenin-1。Calnexin は非 exosome マーカーで、同一細胞量のコントロール。

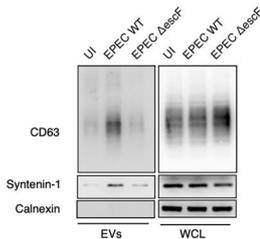


図 3 NieA は exosome の放出を促す

非感染 (UI) またはそれぞれ示した EPEC 菌株を使い、THP-1 を感染した。細胞から放出された exosome を濃縮し、ELISA (Heparin/CD63 ペア) で定量した。

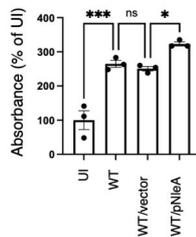


図 4 NLRP3 阻害による exosome の放出量への影響は限定的である

THP-1 細胞を vehicle (-) または MC-950 (50 μ M) を前処理し、EPEC 野生株を感染させた。それぞれ細胞由来の exosome を ELISA で定量した。

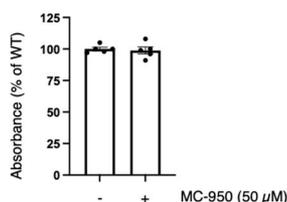


図5 EPEC 感染によって活性化する Caspase-4

非感染または EPEC 感染細胞の細胞抽出液 (WCL) または培地 (Supernatant) 中の Caspase-4 を WB で検出した。Pro-Caspase-4 は非活性化全長の Caspase-4。Intermediates は成熟型なるまでの中間体。-Tubulin は Loading control。

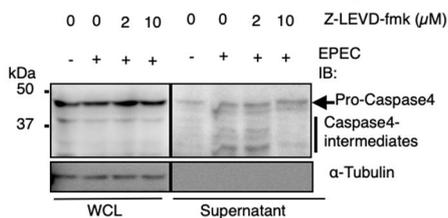


図6 EPEC 感染による exosome 放出は Caspase-4 阻害によって抑制される

Vehicle または Caspase-4 阻害剤 Z-LEVD-fmk (10 μM) で前処理した THP-1 細胞を EPEC で感染し、放出された Exosome 量を ELISA で測定した。

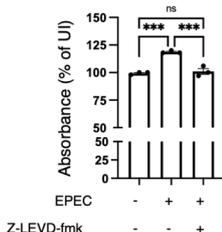


図7 感染細胞由来 Exosome で前処理した細胞はより感染されやすくなる

Mock (PBS)、非感染細胞由来 exosome (EV_{UI}) と感染細胞由来 exosome (EV_{infection}) を同量で Caco-2 に投与し、24 時間培養した。その後、EPEC を添加して感染する。一定の感染時間後、細胞を複数回 PBS で洗浄してから、細胞を溶解した。Lysates を LB agar plate にまき、翌日生えてきたコロニー数を算出した。

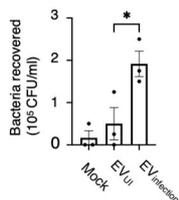
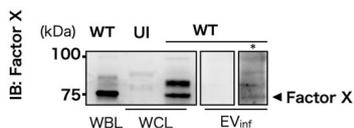
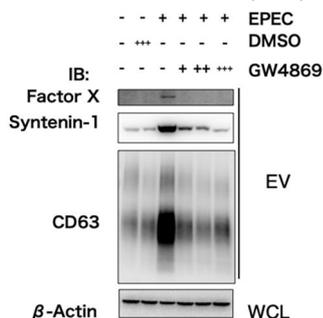


図8 EPEC/EHEC 共通する病原性因子が exosome と伴い放出されている

8a. EPEC 野生株 (WT) 感染細胞より放出された exosome を濃縮し、RIPA バッファーでタンパク質を抽出した (EV_{inf})。WT でタンパク質を分離したのち、Factor X を認識する抗体で prob した。WBL は EPEC 野生株の全菌タンパク質抽出液、WCL は細胞の抽出液。UI は非感染細胞。*は長めの露出タイムの撮影結果。Arrow head は Factor X の位置を示している。



8b. THP-1 を DMSO (10 μM の GW4869 に含む相当量) または GW4869 (+, 0.1 μM; ++, 1 μM; +++, 10 μM) で前処理し、非感染 (UI) または EPEC 野生株 (WT) を感染した。細胞より放出した Exosome を濃縮し、WB でそれぞれ示したタンパク質を特異的抗体で検出した。EV 由来の細胞量は類似を示すために、全細胞抽出液 (WCL) の -Actin を loading control とした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 顔宏哲、戸邊亨
2. 発表標題 Investigating the influence of EPEC infection on the host biogenesis of exosome
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hilo Yen, Toru Tobe
2. 発表標題 Investigating the consequence of EPEC infection on the host biogenesis of exosomes
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（名古屋）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------