

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07481

研究課題名(和文)細胞外小胞を介した細菌の病原性因子の輸送と炎症作用の機序解明

研究課題名(英文)The mechanism in transportation and inflammation of virulent factor which is carried by 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物がつくる非常に小さな細胞外膜小胞が慢性炎症に関与することが知られるようになった。我々は、細菌感染での急性炎症に、細菌とマクロファージ(M_φ)の2種の細胞外小胞が関与していることを明らかにした。大腸菌とマウスM_φの相互作用を解析し、大腸菌から放出される細胞外小胞に内包されたCirAがM_φ由来細胞外小胞(exosomes)を介した過剰な炎症性サイトカインを産生した。またM_φ由来細胞外小胞による炎症反応は、CirAのC末端領域が関与しており、外部周囲環境の鉄濃度が低下したときに増幅された。この2種の細胞外小胞による炎症機構は細菌感染の過剰なサイトカイン産生の原因の1つと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大腸菌感染に伴う炎症が、大腸菌とマクロファージのそれぞれの細胞外小胞惹起され、新たな機構を明らかにした。これは、腸管上皮細胞が傷害を受けた時、腸内細菌叢の非病原性大腸菌が、細胞外小胞を介して炎症を惹起する可能性を示している。細菌の細胞外小胞が拡散する炎症は、既存の抗菌薬では治療できないため、これからの抗菌薬開発において、細菌の細胞外小胞は標的の1つになると考える。本研究結果で明らかにした宿主と細菌の新たな異種細胞間相互作用は、細菌感染症治療に新たな知見を与えると考える。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) are considered to be an inflammatory factor in several acute and chronic inflammatory diseases. The present study shows that EVs (exosomes) from mouse macrophages (M_φ; RAW264.7) elicited by Escherichia coli K-12 strain-derived EVs increased in the expression of pro-inflammatory factors by uninfected M_φ. We identified E. coli protein, CirA (colicin Ia receptor) as such an important factor in inflammatory responses from donor M_φ to recipient M_φ. The C-terminus of the CirA protein, which was relayed from E. coli-derived EVs to M_φ-derived exosomes, promoted exosome-mediated inflammatory responses by uninfected M_φ. Furthermore, CirA expression in E. coli increased under iron-limiting conditions (0.2 μM). Therefore, a low iron concentration would not only increase in the expression of CirA, but also enhance the inflammatory responses relayed by exosomes during E. coli infection of the host.

研究分野：細菌学

キーワード：extracellular vesicles macrophage Escherichia coli inflammation cytokine colicin I receptor

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の細胞は細胞外小胞を産生しており、特にエンドソーム由来細胞外小胞のエキソソームは、50–150 nm と非常に小さな粒子径の膜小胞である。エキソソームは、内包するタンパク質や核酸 (RNA、microRNA、DNA) を介して細胞間相互作用因子として働き、血液・尿・乳汁など体液中に存在して免疫機能、がん¹⁾や高血圧²⁾の病態に関与している。またエキソソームは、ピロリ菌³⁾や腸管出血性大腸菌⁴⁾のタンパク質毒素を運搬して宿主細胞に傷害を与えたことから、細菌感染での病原因子の1つと考えられるようになった。このように特定の細菌感染でのエキソソームの役割は明らかにされつつあるが、多くの病原性細菌の感染におけるエキソソームの役割はほとんど研究されていない。また、細菌から放出される細胞外小胞とエキソソームの相互作用についても不明である。グラム陰性または陽性細菌は、病原性の有無にかかわらず脂質二重膜から構成される粒子径 50–200 nm の細胞外小胞を産生する。グラム陰性細菌の細胞外小胞は、外膜由来小胞 (outer membrane vesicle; OMV) と呼ばれ、微生物間相互作用での OMV の役割として、ファージや抗生物質から細菌を守り、また抗生剤耐性遺伝子などの核酸を水平伝播することが知られている⁵⁾。一方、OMV は toll-like 受容体に結合するリポ多糖を含むことから宿主免疫に影響を与える可能性があり、細菌の急性感染や慢性感染にも深く関与すると予想されている⁶⁾。

そこで、細菌感染症の病態を理解するために、宿主の細胞と細菌に由来する2つの細胞外小胞による同種および異種細胞間相互作用の機序を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

本研究課題は、細胞外小胞を介した大腸菌による炎症誘導機序の理解を目的とする。これまでに申請者は、モデル細菌の1つである大腸菌から放出される細胞外小胞 (OMV) に暴露されたマクロファージが産生する細胞外小胞 (エキソソーム) を介してナイーブなマクロファージに炎症性サイトカイン産生を促すことを発見した。このことは病原体との直接の接触ではなく、細胞外小胞を介して間接的にも炎症が誘導されうることを初めて示したものである。しかし、細胞外小胞に含まれる炎症誘導の鍵となる因子 (病原性分子) については全く不明である。そこで本研究では、細胞外小胞を一つの病原性複合分子として捉え、細菌と宿主の両方面から細胞外小胞に内包される病原性分子の同定とその役割について探索した。本研究により、炎症における細胞外小胞の新たな役割が解明できれば、細胞外小胞を標的とした感染症の治療応用へ展開することが期待できる。

3. 研究の方法

大腸菌の培養と OMV の精製

Escherichia coli K-12 BW25113 strain および遺伝子欠損株はナショナルバイオリソースプロジェクトより分譲された。全ての *E. coli* は LB broth で培養した後、4.5 g/L glucose 含有 Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) 培地で OD₆₀₀=0.0008 に調製し、37 °C で 12 時間培養した。培養液を回収し、2,000 × g で 30 分、10,000 × g で 30 分遠心後、上清を 0.2-mm フィルター濾過した。ろ液を 100,000 × g で 3 時間超遠心した後、得られた沈渣を OMV として PBS (-) に溶解した。

マクロファージの培養とエキソソームの精製

マウスマクロファージ (RAW264.7) は ATCC より購入し、10% fetal bovine serum 含有 D-MEM 培地で培養した。ドナー細胞 (8 × 10⁶ cells/dish) は OMV を添加した D-MEM 培地で 9 時間培養後、新しい D-MEM 培地に交換して 1 時間培養した。さらに新しい D-MEM 培地に交換し 9 時間培養した。培養液を回収し、2,000 × g で 30 分、10,000 × g で 30 分遠心後、上清を 0.2-mm フィルター濾過した。ろ液を 100,000 × g で 3 時間超遠心した後、得られた沈渣をエキソソームとして PBS (-) に溶解した。

遺伝子発現解析

RAW264.7 細胞は、10% fetal bovine serum 含有 D-MEM 培地 (4.5 g/L glucose 含有) で培養した。レシピエント細胞 (5 × 10⁵ cells) は、ドナー細胞 (5 × 10⁵ cells) から得られたエキソソームと 12 時間培養した後、ISOGEN II (Nippon gene) を用いて total RNA を抽出した。炎症性因子の遺伝子発現は、ReverTra Ace quantitative PCR reverse transcription kit (Toyobo) および TB Green premix Ex Taq II (Takara) を用いて、RT-PCR 法で解析した。18S rRNA をハウスキーパー遺伝子として用いた。

4. 研究成果

大腸菌由来細胞外小胞のマクロファージへの作用

大腸菌を用いて、マクロファージ由来エキソソームの役割解析を開始した。まず、大腸菌存在下で培養したマクロファージ (ドナー) のエキソソームは、非感染マクロファージ (レシピエント) に作用して炎症性サイトカイン、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の炎症性因子を増大させることを見いだした (Fig. 1A, B)。また、これらの誘導は死菌ではなく生菌の大腸菌に特異的であった。そこで、大腸菌培養上清に存在する生菌が分泌する

細胞外小胞 (OMV) に着目した結果、OMV の濃度依存的にエキソソームは炎症性因子を誘導した (Fig. 1C)。一方 OMV を取り除いた大腸菌培養上清は誘導しなかった。これらの結果から、大腸菌感染時に細菌由来 OMV がマクロファージに作用することで、マクロファージ由来エキソソームが炎症を引き起こすことが明らかになった。

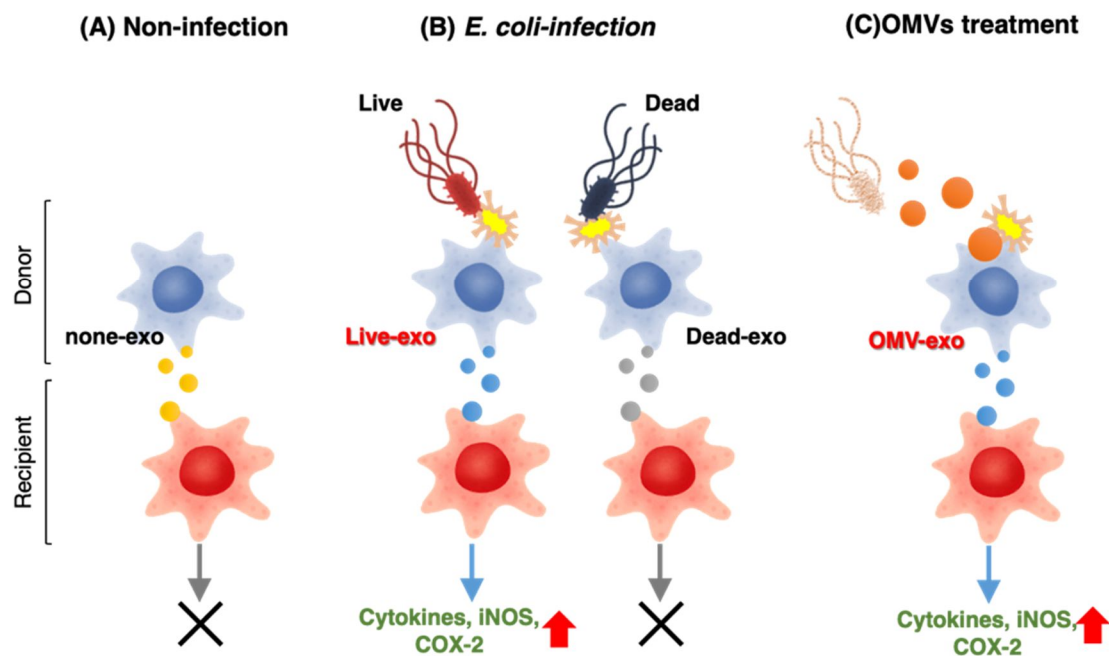


Fig. 1 大腸菌由来細胞外小胞によるマクロファージの活性化

(A) 非感染マクロファージ(Mφ)のエキソソーム(none-exo)は非感染Mφに作用して炎症性因子の発現を増大しない。(B) 死菌ではなく生菌の大腸菌感染Mφのエキソソーム(Live-exo)は非感染Mφに作用してcytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS)、cyclooxygenase-2 (COX-2)の発現を増大した。(C) 大腸菌由来細胞外小胞(OMV)により活性化されたMφのエキソソーム(OMV-exo)は、炎症性因子の発現を増大した。

エキソソーム内包物質の解析

大腸菌感染マクロファージ由来エキソソーム (Live-exo) には RNA、DNA、およびタンパク質が内包されている。そこで Live-exo を RNase または DNase で処理したが、炎症性因子の発現は抑制されなかった。一方、protease 処理済み Live-exo は炎症性因子の発現を抑制した。そこで、非感染 (none-exo)、生菌感染 (Live-exo)、および死菌感染 (Dead-exo) の各エキソソームを MS 解析し、Live-exo にのみ存在する 63 の大腸菌由来たんぱく質を検出した。特にエキソソーム内の存在量が高く、大腸菌由来 OMV に内包されるタンパク質として、OmpA、GroL1、DegP、CirA、および FepA を炎症性因子の誘導に関わる病原因子の候補とした。

エキソソーム内病原因子の同定

大腸菌の増殖に影響を与える GroL1 を除く 4 つの大腸菌由来タンパク質 (OmpA、DegP、CirA、および FepA) の遺伝子欠損株から OMV を精製し、OMV と培養したマクロファージ由来エキソソームの炎症性因子の発現への影響を野生株由来 OMV と比較した。大腸菌 *cirA* 欠損株 (*cirA*) 由来 OMV は、マクロファージ由来エキソソームによる *Tnf-α*、*Il-1β*、*iNos*、および *Cox-2* mRNA の発現を抑制した (Fig. 2)。一方、*ompA*、*degP* および *fepA* 欠損株由来 OMV は、野生株由来 OMV と同様にエキソソームの炎症性因子の発現を増大した。

大腸菌の外膜に存在する CirA は、N 末端ドメインで抗菌ペプチド (colicin Ia) と結合し、C 末端ドメインが内膜タンパク質の TonB と相互作用する colicin Ia receptor である。大腸菌 *cirA* 株由来 OMV にはマクロファージ由来エキソソームによる炎症性因子の誘導作用を減弱したことから、N 末端 (1-157) を発現する大腸菌 (*cirA/N-cirA*) と C 末端 (158-633) を発現する大腸菌 (*cirA/C-cirA*) を *cirA* 株を親株として樹立した。各大腸菌株 OMV を野生型由来 OMV と比較した結果、*cirA/C-cirA* 株由来 OMV は、野生型と同レベルまでエキソソームによる炎症性因子の発現を増大した。一方、*cirA/N-cirA* 株由来 OMV は、*cirA* 株由来 OMV のエキソソームによる炎症性因子発現の抑制を回復できなかった。

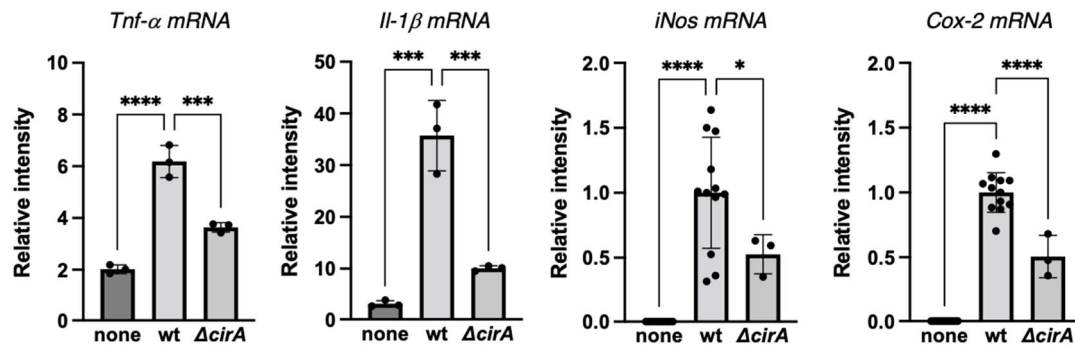


Fig. 2 大腸菌*cirA*欠損株由来OMVの抗炎症作用

マウスマクロファージ(RAW264.7)を大腸菌K-12株の野生株(wt)と*cirA*遺伝子欠損株(Δ *cirA*)由来細胞外小胞(OMV)と12時間培養後、新しい培地に交換して12時間培養した。マクロファージ培養液から精製したエクソソームを、非感染のRAW264.7と12時間培養し、tumor necrosis factor- α (*Tnf- α*)、interleukin-1 β (*Il-1 β*)、inducible nitric oxide synthase (*iNos*)、およびcyclooxygenase-2 (*Cox-2*)のmRNA発現をreal-time PCRで定量した。値はmean \pm SDで示した。有意差検定はOne-way ANOVAおよびTukey'sでおこなった(* P <0.05、*** P <0.005、**** P <0.001)

考察

我々は、大腸菌由来 OMV がマクロファージに作用すると炎症因子を誘導し、さらにそのマクロファージ由来エクソソームによって次々と他のマクロファージへ炎症が拡散される機構を明らかにした。この炎症の惹起には、マクロファージ由来エクソソームに内包された大腸菌 CirA タンパク質が病原因子として作用していることを突き止めた^{7), 8)}。CirA は、抗菌ペプチド Colicin Ia のトランスポーターとして機能する外膜タンパク質であり、サルモネラや緑膿菌にも大腸菌と非常に相同性の高い CirA が発現している。また、大腸菌およびサルモネラの CirA タンパク質は、低鉄条件下 (0.2 μ M Fe³⁺) で発現が増大し、それによって OMV 内の CirA 量も増加したことから、生体内鉄濃度はこれら細菌の OMV による炎症に影響を与えると考える。エクソソームの形成過程でドナー細胞がどのようにして内包物を選択しているかはまだ分かっていないが、哺乳動物細胞は細菌のタンパク質も選別して細胞外に分泌していると考えられる。最近、新潟大学医学部消化器内科の土屋淳紀らとの共同研究により、肝線維化の進行した患者では、抗 CirA 抗体レベルが上昇していることがわかった⁹⁾。肝臓の線維化による門脈圧の上昇が、腸管上皮細胞のバリア機能低下 (すなわち Leaky gut) をもたらし、腸管の細菌由来細胞外小胞が体内に侵入したのではないかと考えている。

本研究では、細菌感染時にマクロファージから分泌される細胞外小胞と細菌由来細胞外小胞が存在する環境で起こる炎症反応に着目し、それぞれの細胞外小胞が感染局所から全身へと細菌の病原因子を連携して運搬することにより、マクロファージ間での炎症が惹起されることを明らかにした。

参考文献

- 1) Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
- 2) Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, et al. (2017) Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. *Hypertension Research* 40, 353–360.
- 3) Turkina M v., Olofsson A, Magnusson KE, et al. (2015) Helicobacter pylori vesicles carrying CagA localize in the vicinity of cell-cell contacts and induce histone H1 binding to ATP in epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 362.
- 4) Watanabe-Takahashi M, Yamasaki S, Murata M, et al. (2018) Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice. *Sci Rep* 8, 10776.
- 5) Schwechheimer C & Kuehn MJ. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13, 605-619.
- 6) Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, et al. (2016) Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell* 165, 1106-1119.
- 7) Imamiya R, Shinohara A, Osada-Oka M, et al. (2023) *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles relay inflammatory responses to macrophage-derived exosomes. *mBio*. Feb 28;14(1)
- 8) 岡 真優子, 今宮里沙, 篠原明莉 . (2022) 細胞外小胞が運ぶ細菌タンパク質と炎症 . *Medical*

Science Digest. 48(11).

- 9) Natsui K, Tsuchiya A, Imamiya R, Osada-Oka M, et. al. (2023) *Escherichia coli*-derived outer-membrane vesicles induce immune activation and progression of cirrhosis in mice and humans. Liver Int. Feb 8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osada-Oka M, Kuwamura H, Imamiya R, Kobayashi K, Minamiyama Y, Takahashi K, Tanaka M, Shiota M.	4. 巻 920
2. 論文標題 Suppression of the doxorubicin response by hypoxia-inducible factor-1 is strictly dependent on oxygen concentrations under hypoxic conditions.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2022.174845.	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 Imamiya R, Shinohara A, Yakura D, Yamaguchi T, Ueda K, Oguro A, Minamiyama Y, Ichikawa H, Horiguchi Y, Osada-Oka M	4. 巻 14
2. 論文標題 Escherichia coli-Derived Outer Membrane Vesicles Relay Inflammatory Responses to Macrophage-Derived Exosomes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0305122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03051-22.	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 Natsui K, Tsuchiya A, Imamiya R, Osada-Oka M, Ishii Y, Koseki Y, Takeda N, Tomiyoshi K, Yamazaki F, Yoshida Y, Ohashi R, Ling Y, Ueda K, Moritoki N, Sato K, Nakajima T, Hasegawa Y, Okuda S, Shibata S, Terai S.	4. 巻 43
2. 論文標題 Escherichia coli-derived outer-membrane vesicles induce immune activation and progression of cirrhosis in mice and humans.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Liver Int	6. 最初と最後の頁 1126-1140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/liv.15539.	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Osada-Oka M, Imamiya R, Shinohara A, Horiguchi Y.
2. 発表標題 The extracellular vesicles from Escherichia coli and macrophages relay signals to stimulate the inflammatory responses on naive macrophages
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今宮里沙、岡 真優子、篠原明莉、堀口安彦
2. 発表標題 大腸菌由来CirAによる細胞外小胞を介したマクロファージの炎症反応
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今宮里沙、岡 真優子、篠原明莉、堀口安彦
2. 発表標題 E. coli-derived CirA induces the pro-inflammatory factors via extracellular vesicles
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 岡 真優子、今宮里沙
2. 発表標題 細菌と宿主の細胞外小胞がもたらす炎症惹起のメカニズム
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今宮里沙、岡 真優子、堀口安彦
2. 発表標題 腸管バリア低下に起因した炎症における細胞外小胞の役割
3. 学会等名 第59回日本栄養食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡 真優子、今宮 里沙、篠原 明莉	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Medical Science Digest	

〔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
---------	---------