

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21044

研究課題名(和文) ヒト血清中に存在する抗結核菌物質の同定と発病リスクとの相関解析

研究課題名(英文) Identification of a novel anti-mycobacterial agent in human serum

研究代表者

山口 雄大 (Yamaguchi, Takehiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40726080

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)：ヒト血清が特異的に有する結核菌増殖抑制効果に着目し、新規の抗結核菌物質の同定を図った。ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) またはウシ型結核菌弱毒株BCGを用いて検討した。ヒト血清中に存在し、タンパク質や核酸など多くの生体分子を内包するエクソソームに注目し検討を行ったが、エクソソームによる抗結核菌作用は認められなかった。また、血清の抗結核菌作用は、非働化により消失し、補体による影響を受けなかったため、血中の抗菌ペプチドの関与が疑われた。今後、さらなる解析により抗結核菌物質の同定を図る。

研究成果の概要(英文)：In the presence of human serum, *Mycobacterium tuberculosis* and BCG cannot grow. In this study, we try to explore a novel anti-mycobacterial agent in human serum, which may suppress mycobacterial growth in healthy persons. We first expected that the exosomes in serum might be involved in this phenomenon, but serum exosomes did not have anti-mycobacterial effect. Rather, exosome-depleted serum could suppress mycobacterial growth. Anti-mycobacterial activity of exosome-depleted serum may be brought by anti-bacterial peptide, such as cathelicidin or defensin, and further examination is required.

研究分野：細菌学

キーワード：高齢者結核

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 結核菌は経気道的に宿主体内に侵入し、肺胞マクロファージ、樹状細胞や単球に感染し、増殖する。マウスやモルモットにおいて結核菌感染は致死性であるが、自然宿主であるヒトにおいて初感染時に発病へと至るのは5%以下と稀である。免疫応答による菌の除去や肉芽腫形成による封じ込めが大きな要因であるが、感染した菌はこれら宿主の防御機構に屈する事なく生体内で生存し続ける(潜伏感染)。

(2) 本邦の新登録結核患者数は平成26年には1.96万人となり、減少傾向にある。一方、かつて結核が蔓延していた時期からの潜伏感染の再燃・発病が近年問題となっている。高齢者結核はその最たる例であり、全結核患者の7割を占めるまでに増加している。従って、急速に社会の高齢化が進む我が国において、高齢者結核の対策は急務である。免疫抑制療法や糖尿病などによる免疫機構の破綻は潜伏感染からの再燃・発病の誘因となる。ところが、高齢者結核患者はこれら免疫不全の素因なく発病していることが殆どであり、免疫機構の破綻という従来の考えだけでは、その発病の機序は十分に説明ができない。そこで、結核菌の自然宿主たるヒトは自らの免疫防御機構に加えて、未知の防御機構によって結核菌の増殖を抑制し、潜伏感染を維持しているのではないかと考えた。両者が機能している間は潜伏感染が維持されるが、特に高齢者結核は後者が破綻することで発病に至るのではないかと考えた。

申請者は予備的検討でウシ血清に比べ、ヒト血清存在下では結核菌の増殖が顕著に抑制される事を見出した。これまで、血清中のサイトカインによる免疫担当細胞を介した結核菌の増殖抑制は知られているが、血清中の成分が直接的に結核菌の増殖を抑制するとの報告は存在しない。

申請者は真核細胞における細胞間情報伝達の新たな担い手として注目を集めているエキソソームの研究を行ってきた。エキソソームは脂質二重膜で覆われた直径40-100 nmの細胞外小胞で、タンパク質、mRNA、microRNA、DNAなどを内包している。最近の研究では、真核細胞のみならず、細菌もエキソソーム様の菌外小胞を産生している事が分かってきた。申請者は、ウシ型結核菌弱毒株BCGにおいても菌外小胞が産生される事を確認しており、結核菌と宿主の間でのエキソソームを介した相互の情報伝達が、宿主の免疫応答や菌の増殖の制御に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト血清による結核菌の増殖抑制の機序を明らかにし、血清エキソソームに焦点を置いて新規の増殖抑制因子の探索・同定を行う。同定された増殖抑制因子の発現を高齢者の結核発病者の血清において解析し、高齢者結核の発病の機序を明らかにする。さらには、発病リ

スクを予測する血清マーカーの開発や、発病を阻止する新規の治療法の開発など、様々な臨床応用を目指す。

(1) ヒト血清より精製したエキソソームが結核菌の増殖抑制効果を有することを明らかにする。

(2) 血清エキソソームを介して結核菌に取り込まれたヒト由来のタンパク質を質量分析によって網羅的に解析、同定する。

(3) 質量分析で同定されたタンパク質の過剰発現細胞を作成する。結核菌との共培養を行い、結核菌の増殖抑制能を確認する。

(4) 結核発病者および未発病者より得られた血清における、同定された抑制因子の発現を解析する。結核の発病リスクとの相関を調査し、新規血清マーカーとしての可能性を模索する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト血清エキソソームの結核菌増殖抑制効果の解析

超遠心法により精製した、ヒト血清エキソソームと可溶性タンパク質を含むエキソソーム除去血清とを精製する。10%ウシ血清含有RPMI-1640培地に血清エキソソームまたはエキソソーム除去血清を加え、結核菌を培養する。ヒト血清エキソソームまたはエキソソーム除去血清の添加による結核菌の増殖阻止を解析する。

(2) 血清エキソソームを介して結核菌に取り込まれたヒト由来のタンパク質の解析・同定

ヒト血清エキソソームを添加した培養結核菌とエキソソームを添加せず培養した結核菌よりタンパク質を抽出する。結核菌へのエキソソームの取り込みを証明するため、ウエスタンブロット法によるエキソソームのマーカータンパク質の発現を検出する。次に、これらのサンプルを用いて、エキソソームを介して取り込まれたヒト由来のタンパク質を質量分析で網羅的に解析・同定する。

(3) ヒト血清の増殖抑制作用に対する耐性結核菌の取得とそのゲノム解析

ヒト血清を添加したRPMI-1640培地で結核菌を長期培養し、ヒト血清による増殖抑制に対して耐性を獲得した結核菌を得る。複数株の耐性結核菌と親株のゲノム解析を行い、複数の耐性株に共通する遺伝子変異を検出し、耐性によって生じた変異遺伝子を同定する。

耐性株の変異タンパク質と親株の野生型タンパク質をクローニングし、大腸菌でタグ融合タンパク質(FLAGタグまたはヒスチジンタグ)を産生する。これを、ヒト血清または可溶化した血清エキソソーム(超遠心法に加え密度勾配遠心を行い精製)と混合した後に、免疫沈降により精製し、質量分析による解析を行う。野生型タンパク質にのみ結合してくるヒト由来のタンパク質を同定し質量分析の結果と照合し、ヒト血清由来の結核菌増殖抑制因子を絞り込む。

(4) 増殖抑制因子の過剰発現細胞を作成し結核菌との共培養

質量分析および耐性菌作成で絞り込んだ、ヒト血清由来の結核菌増殖抑制因子の候補分子をクローニングし、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293T 細胞で過剰発現細胞を作成する。この細胞と結核菌をトランスウェルを用いた共培養で結核菌の増殖を評価する。結核菌の増殖抑制が認められた分子をヒト由来の結核菌増殖抑制因子と同定する。尚、共培養実験は取り扱いの容易さから、まずはウシ型結核菌弱毒株 BCG で行う。効果が認められた場合には、その都度ヒト型結核菌でも同様の実験を行い確認する。

(5) 同定した増殖抑制因子が新規血清マーカーとして有用であることを明らかにする

同意が得られた高齢者の結核発病者および未発症者の血清を用いて、同定した増殖抑制因子の発現をウエスタンブロット法で評価する。本研究では、宿主の免疫機構に依存しない結核菌の増殖抑制因子の同定が目的であるため、免疫抑制療法の既往、糖尿病や慢性腎臓病、担癌状態など免疫機構への影響を及ぼす疾患を有する患者は除外するものとする。また、臨床検体は少なくとも発病者、未発症者ともに 30 検体以上を目標に収集し、解析する。同定した増殖抑制因子の発現量を高齢者の結核発病者と非発病者で比較し、発病リスクを反映するのに有用な新規血清マーカーを同定する。

#### 4. 研究成果

菌の扱いやすさ(封じ込めレベル)から、当初より実験はウシ型結核菌弱毒株 BCG を用いて行った。

<エキソソームの取り込み確認実験>

健常者血清を採取し、超遠心法で血清エキソソームとエキソソーム除去血清とに分離した。まず、精製したエキソソームが BCG 菌体へ取り込まれるか否かを検討した。エキソソーム存在下で培養した菌体を回収し、菌体タンパク質を抽出してウエスタンブロットでエキソソームのマーカータンパク質の発現を確認した。菌体タンパク質からはエキソソームマーカータンパク質である Integrin 1 の発現が認められ、血清エキソソームが抗酸菌内に取り込まれていることが示唆された。

<エキソソームの抗結核菌活性の確認>

次に、BCG を血清エキソソームまたはエキソソーム除去血清存在下で培養し、その増殖を評価した。当初の予想と異なり、血清エキソソームには菌の増殖抑制効果は認められず、エキソソーム除去血清において菌の増殖抑制効果が認められた。同様の実験をヒト結核菌を用いて行ったところ、BCG での実験と同様に、菌の増殖抑制作用を有するのは血清エキソソームではなくエキソソーム除去血

清であることが判明した。

<血清中抗結核菌物質の探索>

一般に、血清由来の抗菌分子として補体が知られる。他にも抗菌ペプチドとして知られる cathelicidin LL-37 や defensin が血清中には存在する。いずれも熱に対し不安定な物性を有するため、非働化(56、30分)により血清の抗結核菌活性が消失するか検討した。非働化処置によって、ヒト血清およびエキソソーム除去血清の抗結核菌活性は消失することが確認された。

さらに、非働化血清中に精製補体を添加、或いは Zymosan を用いた補体除去処理を行い、ヒト血清中での菌の増殖を検討した。BCG および結核菌ともに、補体の添加や補体除去による増殖への影響は認められなかった。

以上の結果より、抗菌ペプチドを含めエキソソーム除去血清中の何らかの成分が抗結核菌活性を有することが明らかとなった。今後の研究で解析・同定を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, Nishiyama M, Tanaka M, Yamaguchi T, Sakurai E, Miura K, Iwao H. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. *Hypertension Res* (査読有) 40: 353-360, 2017. DOI: 10.1038/hr.2016.163
- Woo E, Kato R, Imano H, Fujiwara Y, Ijiri Y, Okada Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Katsumata T, Hayashi T. Capillary Degeneration and Right Ventricular Remodeling Due to Hypoxic Stress with Sugen5416. *Curr Vasc Pharmacol* (査読有) 15: 589-598, 2017. DOI: 10.2174/1570161115666170427154217
- Enany S, Yoshida Y, Tateishi Y, Ozeki Y, Nishiyama A, Savitskaya A, Yamaguchi T, Ohara Y, Yamamoto T, Ato M, Matsumoto S. Mycobacterial DNA-binding protein 1 is critical for long term survival of *Mycobacterium smegmatis* and simultaneously coordinates cellular functions. *Sci Rep* (査読有) 7: 6810, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-06480-w
- Kitajima S, Lee KL, Hikasa H, Sun W, Huang RY, Yang H, Matsunaga S, Yamaguchi T, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promotes cell survival during ammonia stress response in ovarian cancer stem-like cells. *Oncotarget* (査読有) 8(70):114481, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.23010

〔学会発表〕(計 9 件)

山口 雄大, 泉 康雄, 塩田 正之, 富田 修平, 岩尾 洋. 遠隔臓器の一過性虚血処置は心筋梗塞慢性期の心リモデリングを抑制する. 第 25 回日本血管生物医学学会学術集会. 2017 年

山口 雄大, 泉 康雄, 塩田 正之, 北島 正二郎, 松永 慎司, 三浦 克之, 岩尾 洋, 富田 修平. 遠隔臓器の一過性虚血コンディショニングは心リモデリングを抑制する. 第 27 回日本循環薬理学会. 2017 年

山口 雄大. 心血管リモデリングにエキソソームが果たす役割. 第 38 回日本循環制御医学会. 2017 年

前山 順一, 山崎 利雄, 林 大介, 山本 十系子, 尾関 百合子, 鈴木 史子, 山口 雄大, 松本 壮吉, 伊保 澄子, 山本 三郎. 遅延型過敏反応から検討した MDP1 および G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の免疫条件. 日本細菌学会. 2017 年

西山 晃史, Shymaa Enany, 立石 善隆, 尾関 百合子, Anna Savitskaya, 山口 雄大, 西田 由貴子, 阿戸 学, 松本 壮吉. 抗酸菌の長期の生存に必須な細胞機能のヒストン様タンパク質依存的な制御. 日本細菌学会. 2017 年

Mitsuishi R, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Yoshiyama M, Hayashi T. Rivaroxaban attenuates cardiac remodeling due to intermittent hypoxia by suppressing the synergistic effects of PAR-1 and PAR-2. American College of Cardiology 2017, 66<sup>th</sup> Annual Scientific Session & Expo. 2017 年

Kondo T, Fujiwara A, Shimada K, Fujii K, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Yoshiyama M, Hayashi T. Rivaroxaban attenuates diastolic dysfunction and cardiovascular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. 日本心不全学会. 2016 年

Morita S, Fujiwara A, Kondo T, Fujii K, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Hayashi T. Rivaroxaban, but not PAR-2 agonist, attenuates cardiac remodeling due to intermittent hypoxia in sleep apnea model mice. American Heart Association Scientific Sessions 2016. 2016 年

Izumi Y, Yamaguchi T, Osada-Oka M, Shiota M, Tanaka M, Miura K, Tomita S, Iwao H. Macrophage-derived exosomes under hypertensive conditions cause inflammation in endothelial cells. European Society of Cardiology Congress 2016. 2016 年

(1)研究代表者

山口 雄大 (YAMAGUCHI, Takehiro)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40726080

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )