

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15161

研究課題名(和文) Identification of immunomodulation molecules in Mycobacterial ESX secretory systems

研究課題名(英文) Identification of immunomodulation molecules in Mycobacterial ESX secretory systems

研究代表者

郭 姿君 (Guo Tz-Chun) (Guo, Tz-Chun)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部 病理科・研究員

研究者番号：00813065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：結核の病原体宿主相互作用に関わる鍵分子を探索するために、菌のESXシステムから分泌されるタンパク質をコードする遺伝子 ppe26, ppe27 をそれぞれ欠損させたBCG株を作成した。野生型株を対照に、分化させたヒトマクロファージ様細胞株(THP-1)に感染させて、宿主と菌の網羅RNA発現差解析と各種サイトカイン測定を行ったところ、遺伝子欠損株では宿主免疫応答の増強が見られた。これらの分子を制御することは結核の治療、予防につながる可能性があり、注目される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界保健機関の2017年の推計では、世界の新規結核発症者は年間1000万人、結核による死者(HIV陽性者を除く)は年間130万人とされており、結核制圧のための革新的な対策が必要とされている。今回、宿主と菌の相互作用を検討する過程で見出された宿主免疫応答を調節するPPE26, PPE27は、新たな診断、治療薬、ワクチンの開発にとって重要な分子として期待される。

研究成果の概要(英文)：Mycobacteria infection in host cells triggers a dynamic cascade of altered gene expression in both interacting organisms. To elucidate the functional role of ESX-5 secreted PE/PPE proteins in tuberculosis, two BCG deletion mutants, ppe26 or ppe27, were generated by mutagenesis. Macrophage cells were subjected to infection with wild-type and two mutated BCG variants. Dual RNA-seq was performed to unveil the altered gene expression both in the bacteria and infected host cells. Released cytokines were measured by multiplexed bead-based cytokine assay. The overall results from this study suggested the immunosuppressive role of PPE26 and PPE27. This confers the opportunity of manipulating PPE26/27 protein as potential candidate for drug intervention or vaccine development.

研究分野：細菌学

キーワード：結核菌 PPE遺伝子 病原体宿主相互作用 宿主自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関の2017年の推計では、世界の新規結核発症者は年間1000万人、結核による死者(HIV陽性者を除く)は年間130万人とされており、単一の病原体による死者数としては最も多い感染症であり、結核をコントロールするための効率的な結核対策が必要とされている。世界の人口の約3分の1が結核菌に持続感染している潜在性結核感染症(latent tuberculosis infection, LTBI)を有すると推定され、このうち5-10%が生涯のうちいずれかの時点で結核を発症すると言われており、感染者の数の多さを考えると、LTBIから活動性結核の発症を抑制するための新しい診断法や治療法の開発は結核をコントロールするために重要な課題である。

結核菌はヒトに感染したのち、マクロファージの中で持続感染を成立させる。通常の細菌はマクロファージの中で殺菌されてしまうのに対し、結核菌が殺菌作用に抵抗性を発揮するメカニズムはいくつか知られているが、その内の一つに、結核菌がESXシステム(6 kDa early secretory antigenic target secretion systems、別名 type VII secretion systems)によって結核菌のタンパク質を宿主細胞内へ分泌し、これにより宿主の免疫反応を障害しうることが知られている。結核菌に存在する5つのESXシステムのうち、ESX-1の機能の解明は比較的進んでいるのに対し、残りの4つについてはまだ不明な点が多く、結核菌のESXシステムによる分泌作用と、それに対する宿主応答は、LTBIの成立やLTBIから結核の発症などの機序に関わると考えられ、解明が必要である。

2. 研究の目的

結核菌の5つのESXシステムの一つ、ESX-5はPE/PPEと総称される特徴的な一群の結核菌タンパク質の分泌に関わる。結核菌は非常に数多くの*pe/ppe*遺伝子をゲノム上に有しており、結核菌の進化の過程で遺伝子数を増やしてきたと考えられており、またPE/PPEが様々な宿主の免疫応答を惹起することも知られている。また、結核菌全ゲノム配列研究の進展により、*pe/ppe*遺伝子の変異が宿主の免疫で選択される可能性も示唆されている。既報の論文の検討、結核菌全ゲノムデータベースの検討から、我々は特に、マウス感染モデルで免疫応答との関与が報告されているが、ヒト細胞との関わりについては不明であるPPE26とPPE27に着目した。

結核菌が宿主細胞に感染する時、宿主と菌双方の遺伝子発現が動的に変化する。我々は、これらの遺伝子発現変化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析することにより、宿主細胞感染時の*ppe26*、*ppe27*遺伝子の免疫調整における役割を宿主応答と菌側の反応の両面から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、BCG (Bacillus Calmette-Guérin) 株をマクロファージ様に分化誘導したヒトTHP-1細胞に感染させるモデルを用いた。BCGの*ppe26*、*ppe27*遺伝子欠損変異株をそれぞれ作成し、長鎖型シーケンサーであるGridION (Oxford Nanopore)と短鎖型シーケンサーのMiSeq (Illumina)を用いて全ゲノム配列の確認を行った。野生型株とそれら2つの変異株をTHP-1細胞に感染させ、ヒトRNAと菌のRNAを抽出した。宿主細胞と菌のRNA網羅発現解析をNextSeq 500及びMiSeq (Illumina)を用いて行い、CLC Genomics Workbench (QIAGEN)で解析した。発現差が認められた遺伝子はさらにリアルタイムRT-PCRで発現量を検討し、また、細胞培養の上清に分泌されるサイトカインをBio-Plexシステム (BioRad)を用いて測定した。

4 . 研究成果

宿主細胞の RNA 網羅発現解析では、*ppe26*, *ppe27* 遺伝子欠損変異株を用いた場合に、野生型株と比較して宿主自然免疫に関わるシグナル伝達系の亢進が認められた。また、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現定量とサイトカイン測定より、*ppe26*, *ppe27* 遺伝子欠損変異株に対する強い炎症性サイトカイン応答が確認された。これらの結果から、*ppe26*, *ppe27* による宿主免疫抑制効果が示唆された。また、*ppe27* 遺伝子欠損変異株は *ppe26* 欠損株より、さらに強く自然免疫応答を誘導したことから、*ppe27* がヒト細胞での免疫制御に重要な役割を有する可能性がある。また、菌自体の RNA 網羅発現解析でも上記欠損変異株による発現の違いが認められた。

宿主と菌の相互作用の検討で、PPE27 のように宿主免疫応答に深く関わる分子を見出すことは、今後の診断/治療ターゲット分子の解明やワクチン開発の礎になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tz-Chun Guo
2. 発表標題 Dual RNA-seq reveals the immunosuppressive role of ESX-5 associated PPE26/PPE27 proteins of M. bovis BCG during infection of macrophages
3. 学会等名 第4回 抗酸菌研究会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----