

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16651

研究課題名(和文)結核菌由来メンブレンヴェシクルが菌の宿主内潜伏に果たす役割と分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Molecular Mechanism of Mycobacterial Latency via Mycobacterial Membrane Vesicles

研究代表者

山口 雄大(Yamaguchi, Takehiro)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

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):人類最古の感染症の一つである結核は、今なお年間140万の人命を奪い甚大な被害をもたらしている。結核の撲滅を困難にしている一因として、その原因菌であるヒト結核菌の休眠・宿主内潜伏という特異な性質が挙げられる。本研究では、菌が産生する細胞外小胞(メンブレンベシクル:MV)に着目して結核菌の潜伏の分子機構解明を図った。組換え菌作成により、MV産生制御因子の同定を試みた。一方で、MVが宿主免疫に及ぼす影響についても解析を行なった。培養条件の違いによって、MVの免疫刺激活性、免疫原性が大きく変化することが明らかになった。さらには、MVの免疫誘導性を利用した新たな結核ワクチン開発の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦での新規登録結核患者数は減少傾向にあるが、全世界的にはアジア・アフリカ・南米を中心に、結核はいまだに猛威をふるっている。新規抗結核薬の開発などにより結核死亡者数は減少傾向にあるものの、HIV陽性患者における結核死、多剤耐性結核の発生は増加しており、結核の撲滅には依然として解決すべき課題が山積している。

ウシ型結核菌弱毒株BCGワクチンは唯一確立された結核予防法であるが、その有効性は小児期に限られること、時にBCG感染症の副作用が出現することなど、問題点も指摘されている。抗酸菌由来の膜小胞の新規結核ワクチンへの応用は、結核制御への新たなアプローチとなりうる。

研究成果の概要(英文):Tuberculosis (TB), one of the oldest infectious diseases known to mankind, still claims 1.4 million lives annually and causes tremendous damage. One of the factors that make the eradication of TB difficult is the unique properties of the causative agent, Mycobacterium tuberculosis (Mtb), such as dormancy and latency in the host. Here, we investigated the role of mycobacterial membrane vesicles (MVs), the extracellular vesicles from bacteria, in latency of Mtb. By creating recombinant bacteria, we attempted to identify the regulators of MV production. On the other hand, we also analyzed the impact of MV on host immunity. It became clear that the immunostimulatory activity and immunogenicity of MVs changed significantly depending on the culture conditions of MV-donor cells. Furthermore, the possibility of developing a novel vaccine against TB using mycobacterial MVs was demonstrated.

研究分野:細菌学

キーワード:結核 メンブレンヴェシクル

1. 研究開始当初の背景

三大感染症の一角を担い、未だ年間 140 万もの人命を奪い続ける結核は、エジプトのミイラにもその痕跡が見られる、人類最古の感染症の一つである。病因たる結核菌はヒトを宿主に感染するが、感染後速やかに増殖せず、宿主細胞内で休眠菌となり数年から数十年と長期に渡る潜伏を果たす。結核菌の潜伏感染者数は、全世界人口の 4 分の 1 に及び、そのうち年間 5-10% が結核を発症する。即ち、結核の制圧には潜伏感染者への介入が必須であり、結核菌の休眠・潜伏の詳細な機序の解明とそれに伴う新規治療標的の創出が求められている。

いずれの細菌種もタンパク質や脂質、核酸で構成される細胞外膜小胞 (Membrane Vesicle, MV) を産生する。MV は細菌-細菌間だけでなく、細菌-宿主間における細胞間情報伝達を担っていると考えられているが、MV が菌の生存や宿主へ与える影響など、その役割は十分に理解されていない。多くの細菌種から産生される MV は免疫誘導性を有し、MV を用いたワクチン開発研究が盛んに行われている。事実、髄膜炎菌由来の MV を用いた髄膜炎起因ワクチンは既に欧米で上市されている。一方で、結核菌の MV に関しては、宿主免疫応答に対して抑制的な作用を有することがこれまでに報告されている。結核の疾患起因性を考慮すると、この作用は結核菌に特徴的な宿主内潜伏において重要な役割を果たしている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は、結核菌が宿主免疫を回避して潜伏を達成する分子機序を解明し、最終的には潜伏を阻害することで宿主細胞による殺菌を促す、新たなコンセプトの治療開発を目指す。

具体的には、(1) 遺伝子組換えにより MV 低産生・高産生株を作成し、MV が菌の増殖や潜伏に果たす役割を明らかにし、(2) MV のもつ免疫学的性状の解析を、培養細胞や動物 (マウス) を用いて行う。

3. 研究の方法

取り扱いの容易さから結核菌近縁で非病原性の *Mycobacterium smegmatis* や、ウシ型結核菌弱毒株 BCG を用いて、以下の研究を実施した。

- (1) CRISPR interference (CRISPRi) を用いて組換え抗酸菌株を作成し、MV 産生制御因子を同定すると共に、MV 低産生・高産生株を作成する。

MV に発現するタンパク質を質量分析にて同定し、*M. smegmatis* や BCG でこれらの分子の発現抑制 (KD) 株を作出、MV 産生量を評価して MV 産生制御因子の探索を行う。その結果をもとに作出した、MV 低産生・高産生株を用いて感染実験を実施して、菌の宿主内生存における MV の役割を解明する。

- (2) BCG 由来 MV のもつ免疫学的性状の解析

i. 自然免疫刺激活性の評価

ヒト由来マクロファージ様 THP1 細胞を BCG 由来 MV で刺激、サイトカイン・ケモカイン産生を評価する。

ii. 免疫原性の評価

BCG 由来 MV を用いて、マウスを免疫して BCG 特異的な抗体産生誘導の評価を通して、MV のもつ免疫原性を評価する。

4. 研究成果

- (1) 予備検討で、結核菌由来 MV に発現する全タンパク質の同定を質量分析で行っていた。

その結果から、大腸菌などで既知の MV 産生制御因子と相同性の高い分子を結核菌での MV 産生制御因子の候補とした。分子の局在性や機能、MV での発現量などから、5 つの分子に候補を絞り、CRISPRi を用いて *M. smegmatis* で KD 株を作出した。5 つの候補分子のうち、1 分子では MV 量に変化が認められなかったが、1 分子では KD により MV 量が顕著に減少、残りの 3 分子では KD により MV 量が顕著に増加した。

次に、BCG でもこれら 5 つの分子の KD 株の作出を試みた。*M. smegmatis* で KD により MV 量が減少した分子を、BCG で KD しても MV 量の減少は認められなかった。他の分子でも KD により MV 量が減少する分子は認められず、MV 低産生株の作出ができなかった。

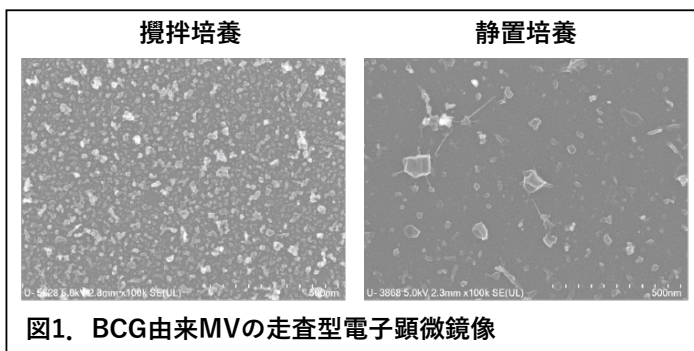
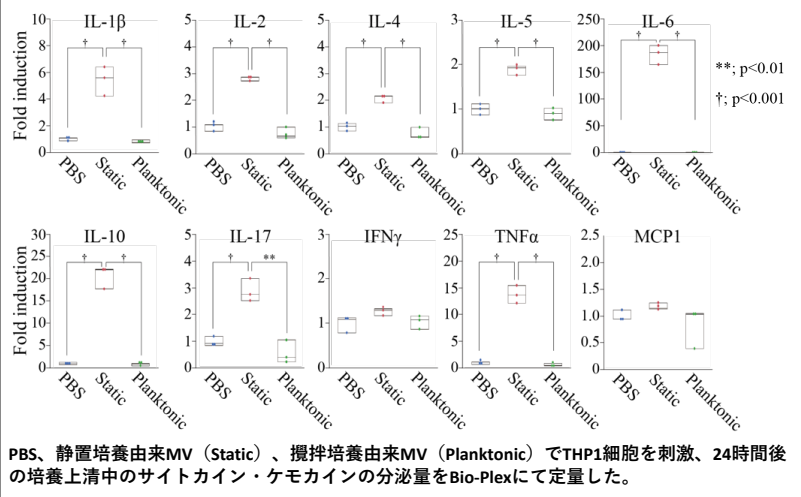


図1. BCG由来MVの走査型電子顕微鏡像

(2-i) 2つの異なる培養条件(攪拌培養、静置培養)で得られた BCG 由来の MV (図 1、走査型電子顕微鏡像)を用いて分化 THP1 細胞を刺激、qPCR 法によりサイトカイン・ケモカインなど炎症関連の遺伝子発現を評価したところ、静置培養由来の MV ではインターロイキン (IL) -6 と IL-10 の発現が有意に上昇するが、攪拌培養由来の MV ではいずれの遺伝子も発現が変化しなかった。次に、MV

で刺激した分化 THP1 細胞の培養上清を用いて、Bio-Plex により網羅的なサイトカイン・ケモカインの産生量を評価した。qPCR での検討と同様に、静置培養由来の MV では IL-1 β や IL-6、IL-10、IL-17、腫瘍壊死因子 α など様々なサイトカイン・ケモカインの産生が誘導された。一方で、攪拌培養由来の MV ではいずれも産生誘導されなかった (図 2)。さらに、CRISPR/Cas9 法を用いて、Toll 様受容体 (TLR) 2 欠損 THP1 細胞を作成、分化した細胞を MV で刺激したところ、野生株 THP1 細胞で認められたサイトカイン産生誘導が欠損株では完全に消失した。以上の結果から、静置培養で得られた BCG 由来の MV は TLR2 を介して自然免疫を刺激することが明らかとなった。

図2. BCG由来MVによるサイトカイン・ケモカイン産生誘導

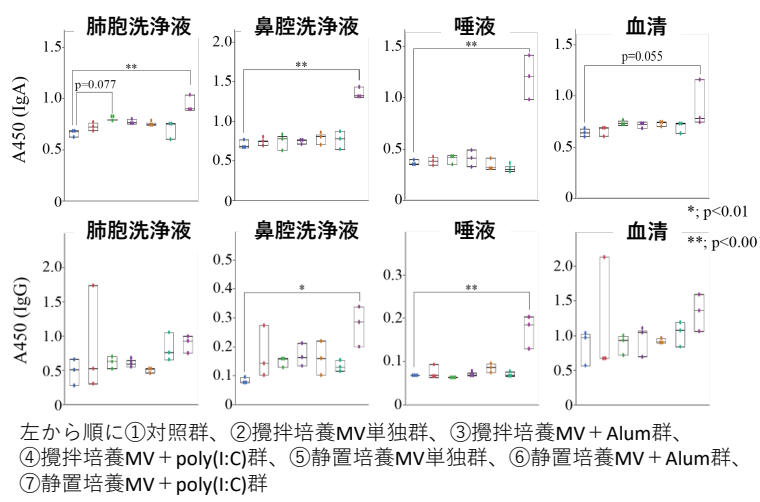


PBS、静置培養由来MV (Static)、攪拌培養由来MV (Planktonic) でTHP1細胞を刺激、24時間後の培養上清中のサイトカイン・ケモカインの分泌量をBio-Plexにて定量した。

(2-ii) 攪拌培養、静置培養から得られた MV をアジュバント (poly(I:C)または Alum) を併用して、6-8 週齢雌性 BALB/c マウスに経鼻免疫した。1 回目の免疫の 3 週間後に再度免疫を行い、その 2 週間後にマウスを剖検して血清、唾液、肺胞洗浄液、鼻腔洗浄液を得た。BCG 菌体成分を固相化した 96 ウェルプレートを用いて、各サンプル中の抗 BCG 抗体 (IgA および IgG) の量を ELISA にて半定量した。自然免疫刺激活性の弱い攪拌培養由来の MV は単独でも、アジュバントを併用しても有意な抗体産生は認められなかった。一方で、強い自然免疫刺激活性を示した静置培養由来の MV は単独では抗体産生を誘導できなかったが、アジュバントとして poly(I:C) を併用することで、有意に抗体産生を誘導できた (図 3)。

一方で、強い自然免疫刺激活性を示した静置培養由来の MV は単独では抗体産生を誘導できなかったが、アジュバントとして poly(I:C) を併用することで、有意に抗体産生を誘導できた (図 3)。

図3. BCG由来MVの経鼻免疫による抗BCG抗体産生誘導

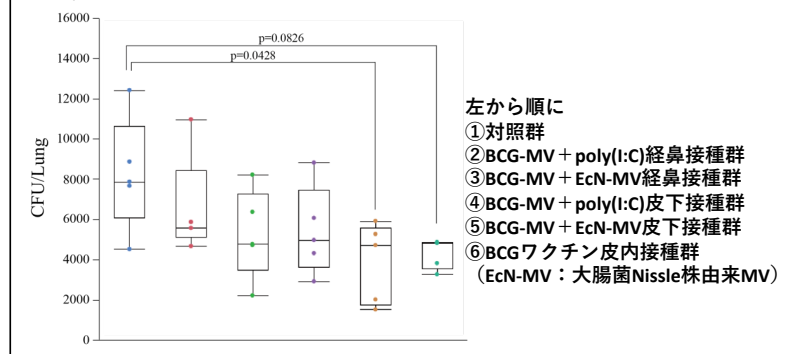


左から順に①対照群、②攪拌培養MV単独群、③攪拌培養MV + Alum群、④攪拌培養MV + poly(I:C)群、⑤静置培養MV単独群、⑥静置培養MV + Alum群、⑦静置培養MV + poly(I:C)群

次に、静置培養由来の MV により誘導された抗体が、感染防御に寄与するかを検討した。MV をアジュバント併用下で、6-8 週齢雌性 BALB/c マウスに経鼻または皮下投与により 3 週間隔で 2 回免疫し、その 2 週間後に BCG を経鼻感染させた。感染から 2 週間後に剖検して肺を摘出、肺内の BCG 生菌量を評価した。ア

ジュバントとして大腸菌 Nissle 株由来の MV を用いて、BCG 由来 MV を皮下接種した群で、BCG ワクチンと同等の肺内生菌数の減少が認められた (図 4)。

図4. 静置培養から得たBCG由来MV免疫の感染防御能の評価



左から順に
①対照群
②BCG-MV + poly(I:C)経鼻接種群
③BCG-MV + EcN-MV経鼻接種群
④BCG-MV + poly(I:C)皮下接種群
⑤BCG-MV + EcN-MV皮下接種群
⑥BCGワクチン皮下接種群
(EcN-MV: 大腸菌Nissle株由来MV)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nishiuchi Yukiko, Tateishi Yoshitaka, Hirano Hiroshi, Ozeki Yuriko, Yamaguchi Takehiro, Miki Mari, Kitada Seigo, Maruyama Fumito, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct Attachment with Erythrocytes Augments Extracellular Growth of Pathogenic Mycobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02454-21	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 Imano Hideki, Kato Ryuji, Nomura Atsuo, Tamura Maki, Yamaguchi Yudai, Ijiri Yoshio, Wu Hong, Nakano Takashi, Okada Yoshikatsu, Yamaguchi Takehiro, Izumi Yasukatsu, Yoshiyama Minoru, Asahi Michio, Hayashi Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Rivaroxaban Attenuates Right Ventricular Remodeling in Rats with Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-01011	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 Hayashi, T., H. Imano, R. Kato, Y. Ijiri, T. Yamaguchi, Y. Izumi, A. Nomura, and M. Yoshiyama.	4. 巻 3
2. 論文標題 Protease-Activated Receptor-1 Inhibition by FR171113 Attenuates Cardiac Remodeling Due to Intermittent Hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Cardiol Vasc Med	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nishide Shunji, Uchida Junji, Matsunaga Shinji, Tokudome Kentaro, Yamaguchi Takehiro, Kabei Kazuya, Moriya Taiki, Miura Katsuyuki, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei	4. 巻 -
2. 論文標題 Prolyl-hydroxylase inhibitors reconstitute tumor blood vessels in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.02.010	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 Kabei Kazuya, Tateishi Yu, Shiota Masayuki, Osada-Oka Mayuko, Nishide Shunji, Uchida Junji, Nakatani Tatsuya, Matsunaga Shinji, Yamaguchi Takehiro, Tomita Shuhei, Miura Katsuyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 93 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.12.002	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 Ishikawa H, Izumiya Y, Shibata A, Ichikawa Y, Yamaguchi T, Yamaguchi Y, Kitada R, Iwata S, Ehara S, Tomita S, Hanatani A, Yoshiyama M	4. 巻 -
2. 論文標題 Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor represents exercise tolerance and predicts adverse cardiac events in patients with heart failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart and vessels	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-019-01538-3	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 Osada-Oka Mayuko, Goda Nobuhito, Saiga Hiroyuki, Yamamoto Masahiro, Takeda Kiyoshi, Ozeki Yuriko, Yamaguchi Takehiro, Soga Tomoyoshi, Tateishi Yu, Miura Katsuyuki, Okuzaki Daisuke, Kobayashi Kazuo, Matsumoto Sohkiichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for Mycobacterium tuberculosis infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 781 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz048	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 Nishide Shunji, Matsunaga Shinji, Shiota Masayuki, Yamaguchi Takehiro, Kitajima Shojiro, Maekawa Yoichi, Takeda Norihiko, Tomura Michio, Uchida Junji, Miura Katsuyuki, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei	4. 巻 19
2. 論文標題 Controlling the Phenotype of Tumor-Infiltrating Macrophages via the PHD-HIF Axis Inhibits Tumor Growth in a Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 940 ~ 954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.08.033	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 Nakagawa Takatoshi, Furukawa Yuichi, Hayashi Tetsuya, Nomura Atsuo, Yokoe Shunichi, Moriwaki Kazumasa, Kato Ryuji, Ijiri Yoshio, Yamaguchi Takehiro, Izumi Yasukatsu, Yoshiyama Minoru, Asahi Michio	4. 巻 42
2. 論文標題 Augmented O-GlcNAcylation attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac remodeling through the suppression of NFAT and NF- B activities in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1858 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0311-x	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Samukawa Noriaki, Yamaguchi Takehiro, Ozeki Yuriko, Matsumoto Sohkiichi, Tokudome Kentaro, Matsunaga Shinji, Tomita Shuhei
2. 発表標題 CRISPR Interference-based Screening for Prediction of Synergistic/Additive Effects of Novel Combinations of Anti-Tuberculosis Drugs
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokudome Kentaro, Ueki Masaaki, Nakamura Atsuki, Yamaguchi Takehiro, Matsunaga Shinji, Tomita Shuhei
2. 発表標題 Fetal hypoxia caused decrease of gliogenesis-related gene expression in rat
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsunaga Shinji, Yamaguchi Kazuyuki, Hirakawa Ryo, Tokudome Kentaro, Yamaguchi Takehiro, Tomita Shuhei
2. 発表標題 Effect of hypoxia-inducible factors in tumor infiltrating macrophage on tumor growth
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 雄大、寒川 訓明、尾関 百合子、松本 壮吉、富田 修平
2. 発表標題 抗酸菌のプロテアーゼclpは有望な新規抗結核薬標的である
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 西山 晃史、古寺 哲幸、清水 将裕、Anna Savitskaya、尾関 百合子、真柳 浩太、山口 雄大、立石 善隆、松本 壮吉
2. 発表標題 Inactivation of DNA function by intrinsically disordered histone-like protein in mycobacteria
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 Yamaguchi Takehiro、Samukawa Noriaki、Nakao Ryoma、Tomita Shuhei
2. 発表標題 Development of anti-TB vaccine using mycobacterial membrane vesicles
3. 学会等名 EMBO Workshop Bacterial membrane vesicles (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 雄大、中尾 龍馬、富田 修平
2. 発表標題 BCG由来メンブレンヴェシクルを用いた結核ワクチン開発研究
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 西山 晃史、古寺 哲幸、清水 将裕、Anna Savitskaya、Shymaa Enany、真柳 浩太、山口 雄大、尾関 百合子、立石 善隆、松本 壮吉
2. 発表標題 低酸素休眠抗酸菌の腫瘍タンパク質Mycobacterial DNA-binding protein 1
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 山口 雄大、尾関 百合子、松本 壮吉、徳留 健太郎、松永 慎司、富田 修平
2. 発表標題 抗酸菌のプロテアーゼclpは創薬標的として有望である
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳留 健太郎、植木 正明、山口 雄大、松永 慎司、富田 修平
2. 発表標題 発達期の低酸素状態は脳内の発達障害関連部位においてアストロサイトを低下させる
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永 慎司、山口 一行、徳留 健太郎、山口 雄大、富田 修平
2. 発表標題 腫瘍血管形成に対するPHD阻害薬の効果検討
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 雄大, 富田 修平
2. 発表標題 Analysis of the Host Immune Response against Mycobacterial Membrane Vesicles
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山口 雄大
2. 発表標題 Exploring the Role of Mycobacterial Membrane Vesicles toward Vaccine Development
3. 学会等名 日本細菌学会
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
---------	---------