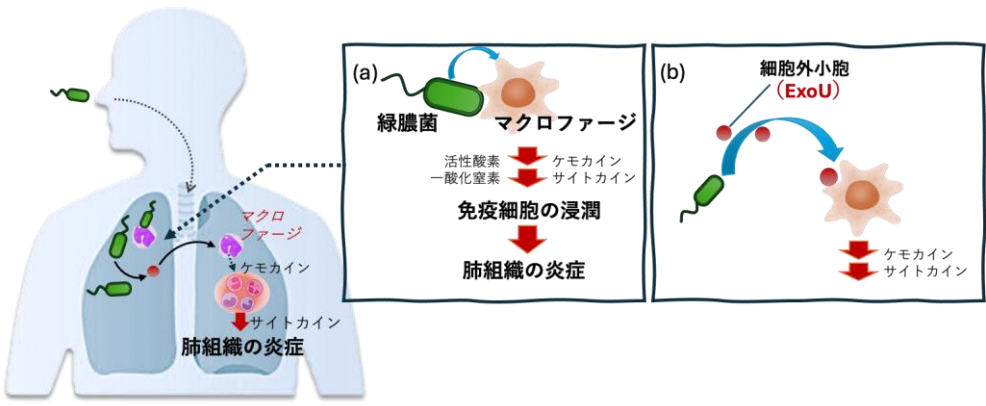


京都府公立大学法人両大学連携・共同研究支援事業研究成果

事項	所属	職名	氏名
研究代表者	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科	准教授	岡 真優子
研究組織の 体制	京都府立医科大学 麻酔科	助教	木下 真央
	京都府立大学 生命環境学部	助手	篠原 明莉
研究の名称	高病原性緑膿菌ExoU発現株の細胞外小胞による毒素作用		
研究の キーワード	緑膿菌、細菌毒素、炎症		
研究の概要	緑膿菌は、急性肺上皮傷害や敗血症を引き起こし、慢性肺線維症の原因となる病原性細菌である。本菌の感染は、特に免疫力の低下した高齢者にとって致死的な影響を与えるが、近年多剤耐性緑膿菌の出現により年齢を問わず抗菌薬による治療が困難となっている。多剤耐性菌は世界中に拡大しているため、新たな抗菌薬の開発は地球規模の課題であるにもかかわらず、その開発は停滞している。なぜなら、これまで開発された抗生物質やそのリード化合物は、多くの耐性菌を生み出しており、新たな抗菌薬には抗生物質とは異なる作用機序が求められているからである。毒素産生の抑制は、新たな抗菌薬の作用点の1つと考えられている。 そこで我々は、新たな抗菌薬の標的分子として細菌の放出する細胞外小胞に着目した。細菌の細胞外小胞は、宿主細胞膜への直接作用や細胞内へ取り込まれることによって、宿主に炎症や細胞傷害をもたらす新たな病原因子として注目されている。さらに、一部の病原細菌の細胞外小胞から毒素タンパク質が検出されたことから、細胞外小胞は、菌体成分・菌体外毒素・エフェクター分子に分類される細菌毒素の全てを内包できる毒素のカプセルと捉えることができると考えた。これまで、細菌の病原性の強さと毒素産生量は比例関係にあることが示されており、細胞外小胞は細菌の病原性を評価する上で重要な因子と考える。 木下らは、緑膿菌による宿主細胞への毒性作用を担うエフェクター分子ExoUが、本菌の病原性と強く関連することを報告してきた。分離される緑膿菌の20～25%の高病原性緑膿菌に発現するExoUは、緑膿菌のIII型分泌装置によって菌体から宿主細胞へ直接注入される毒素タンパク質である。不活性な前駆体として細菌から分泌されたExoUは、宿主の細胞内に存在する分子によってホスホリパーゼA₂の活性を示す。しかし、細胞外小胞による分泌機構でExoUが菌体外へ放出されるかについては不明であった。そこで本研究では、緑膿菌の新たな病原因子となる細胞外小胞と高病原性緑膿菌のもつExoUに着目し、ExoU発現レベルの異なる緑膿菌の臨床分離株を用いて、細胞外小胞と宿主の細胞傷害作用を解析した(図1)。		

	 図1 緑膿菌の肺感染による慢性肺線維症への悪化進展機構 (a) 体内に侵入した緑膿菌はマクロファージに貪食されて殺菌されるが、そのときにケモカインやサイトカインが多量に産生され多くの免疫細胞が浸潤する。(b) 緑膿菌の細胞外小胞がマクロファージに作用すると炎症が惹起する。 本研究から、高病原性緑膿菌は毒素タンパク質のExoUとⅢ型分泌装置を構成するPcrVタンパク質を内包した細胞外小胞を放出することが明らかとなった。
研究の背景	グラム陰性細菌の緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) は、細胞外小胞 (Extracellular vesicles : EV) を放出する。細菌のEVは、毒素や酵素などのタンパク質や核酸を内包しており、宿主に炎症を起こす。これまで、ヒト単球系マクロファージ (THP-1) において、緑膿菌実験株 (PAO1株) 由来EVが、免疫細胞の走化や分化促進を引き起こすchemokine (c-c motif) ligand 2 (CCL2) mRNA発現を増大することを見出した。しかし、PAO1株以外の緑膿菌のEVは解析されていない。また、臨床分離株の高病原性緑膿菌は、毒素タンパク質ExoUとこれを分泌するⅢ型分泌装置を保有しており、これらは全身性炎症症候群の病態形成に関わっている。しかし、高病原性にEVが関与するのかは不明である。各緑膿菌株由来EVの病原性を比較するためにはEVを定量する必要があるが、非常に小さな膜小胞であるため定量は困難である。岡らは、EVに内包されるPhoA (alkaline phosphatase : ALP) の活性によるEVの定量法を構築した。この方法を利用して、高病原性緑膿菌のEVの宿主細胞への影響を解析することとした。
研究の進捗状況と成果	これまで、緑膿菌実験株 (PAO1) の細胞外小胞 (EV) をイオン交換クロマトグラフィーでフラクションを分離し、alkaline phosphatase (ALP) 活性による EV の定量法を構築した。本研究では、高病原性緑膿菌 PA103 株の野生株 (WT) と TypeⅢ型分泌装置を構成する PcrV の遺伝子欠損株 ($\Delta pcrV$) の培養液から EV を精製し、両株由来 EV の ALP 活性および病原性を比較した。WT 株および $\Delta pcrV$ 株由来培養液のフラクション (Fr. 1-35) において、両菌株の Fr. 21-26 が高い ALP 活性を示し、最も高い ALP 活性を示した Fr. 24 が EV を多く含む画分と決定した。そこで、Fr. 17-25 をヒトマクロファージ (THP-1) の培養液中に添加した結果、Fr. 24 がケモカイン CCL2 mRNA 発現を増大させた。また、WT 株および $\Delta pcrV$ 株由来 EV (Fr. 24) に ExoU が検出され、WT 株由来 EV は PcrV を内包することがわかった。WT 株と $\Delta pcrV$ 株の EV による

	<i>CCL2</i> mRNA 発現量に差が無かったことから、本遺伝子誘導に PcrV タンパク質は関与していないと考えられる。京都府立医大で分離された高病原性緑膿菌臨床分離株 (3 株) においても PA103 株と同様に、Fr. 23-26 は高い ALP 活性と THP-1 細胞で <i>CCL2</i> mRNA 発現の増大を示した。 本研究結果から、高病原性緑膿菌は、毒素タンパク質 ExoU とⅢ型分泌装置を構成する PcrV タンパク質を内包した EV を放出しており、宿主細胞のケモカイン誘導を引き起こした。緑膿菌はマクロファージに抗原として認識され、マクロファージのケモカインやサイトカイン分泌を促すことはよく知られていることだが、本研究では緑膿菌の EV もまたマクロファージの抗原としての役割を持ち、サイトカイン分泌を促す作用を有することが明らかになった。そこで次年度の研究計画では、緑膿菌由来 EV のワクチン効果について調べる。EV の経鼻投与がマウス緑膿菌性肺炎モデルにおいて、感染予防効果を発揮できるか、また EV に内包される PcrV タンパク質のワクチン効果の影響について検討する。
地域への研究成果の還元状況	緑膿菌感染症は、近年多剤耐性菌の増加に伴い抗菌薬治療が困難になっている。しかし、これに対するワクチンはなく、感染症の予防方法がない。細菌非存在下でも緑膿菌由来EVがマクロファージの抗原として機能することが明らかになった。本研究は、緑膿菌感染症を予防するために、未だ開発されていない緑膿菌ワクチンの開発に繋がる可能性がある。
研究成果が両大学連携にもたらす意義	両研究グループの交流は、2022年度四大学フォーラムから始まり、ミーティングを重ねて本研究プロジェクトを立ち上げるに至った。本研究は、木下らの研究グループが発見したExoUの宿主細胞に対する毒素作用に関する豊富な知見を基盤に、岡が精製する細胞外小胞による新しい毒素作用を解析した。この研究課題では、高病原性の緑膿菌と細胞外小胞の精製技術が求められ、両研究グループでしかなしえない研究結果を得ることができた。
研究発表	英文論文 (1報) Ohara J, Fujiki J, <u>Kinoshita M</u>, Sudo K, Kawaguchi K, Inoue K, Naito Y, Moriyama K, Nakamura T, Iwano H, Sawa T. Effects of the combination of anti-PcrV antibody and bacteriophage therapy in a mouse model of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pneumonia. <i>Microbiology Spectrum</i> 12 (12), 2024. 学会発表 (1件) <u>Mayuko Oka</u>, <u>Akari Shinohara</u>. Purification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> secretions that induce chemokines in macrophages. 第97回日本細菌学会総会ワークショップ. 2024年8月 (札幌)