様式(7)

論 文 内 容 要 旨

報告番号	甲 栄 第 302 号	氏名	東山 諒
題 目	Characterization of Outer Membrane Vesicles Produced by *Vibrio vulnificus* （*Vibrio vulnificus*から産生される細胞外小胞の特徴について）		

*Vibrio vulnificus*は温暖な水生環境下に生息する好塩性のグラム陰性菌であり食中毒の原因菌として知られているが、海産物を介した経口感染の他に、傷口に接触することで生じる創傷感染の原因菌としても知られている。*V. vulnificus*感染は下痢、嘔吐、腹痛などの症状を引き起こすが慢性肝疾患や免疫不全などの基礎疾患を持つ患者では壊死性筋膜炎や原発性敗血症を発症し重症化することが多く、高い致死率を有する。急速に病態が進行するため抗生物質治療は効果が低く、*V. vulnificus*の病原性機序を解明することが重要であると考えられている。過去の研究では、*V. vulnificus*の主な毒性因子として、細胞質溶解ヘモリジン（VvhA）、多機能サイトトキシン（RtxA1）、メタロプロテアーゼ（VvpE）等が同定されているが、これらの病原因子が輸送されるメカニズムと急性敗血症との間の関連性は明らかとなっていない。そこで本研究ではグラム陰性菌が産生する細胞外小胞（OMVs：Outer membrane vesicles）に着目した。OMVsは様々なグラム陰性菌において毒素の輸送に関与しているとの報告があるが、*V. vulnificus*が産生するOMVs（Vv-OMVs）の病原性や性質に関する研究はほとんど実施されていない。本研究では、Vv-OMVsの性質に関する解析を行い、*V. vulnificus*の病原性機序との関連性を明らかにすることを目的とした。

*V. vulnificus*及び採取したOMVsをヒト小腸上皮細胞株INT407に作用させ、数時間後の細胞形態の変化及びCytotoxity LDH Assayによる乳酸脱水素酵素（LDH）の放出を評価した。*V. vulnificus*感染時において高いLDH放出を伴う細胞死の誘導を確認した一方、OMVsを添加した細胞では、LDH放出を伴わない細胞の剥離反応が認められた。VvhA・RtxA1を欠損した*V. vulnificus*株由来のOMVsでも同様の細胞剥離が認められたことから、既知の毒性因子以外のタンパク質が関与している可能性を示した。加えて、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いた実験から、セリンプロテアーゼ様の作用を有するタンパク質が関与している可能性を示した。さらに液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS/MS）でVv-OMVに内包されるタンパク質について網羅的に解析を行った結果、42種類のVv-OMVに特徴的なタンパク質を見出すことに成功した。Vv-OMVsによる細胞剥離は処理後短時間で効果が認められることから、Vv-OMVsに含まれる特徴的なタンパク質のうちセリンプロテアーゼ様の機能を有するものが周囲の細胞との接着を阻害し、全身性かつ急速な病態形成に寄与していると考えられた。本研究は、*V. vulnificus*が引き起こす急性敗血症にOMVsが関連していることを示唆するものである。

様式(10)

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 栄 第 302 号	氏名	東山　諒
審査委員	主査　酒井　徹 副査　瀬川　博子 副査　内田　貴之		

題目　Characterization of Outer Membrane Vesicles Produced by *Vibrio vulnificus*
（*Vibrio vulnificus*から産生される細胞外小胞の特徴について）

著者　Ryo Higashiyama, Yuna Kanda, Takaaki Shimohata, Kai Ishida, Shiho Fukushima, Kohei Yamazaki, Takashi Uebanso, Kazuaki Mawatari, Takashige Kashimoto, Akira Takahashi

令和　5 年　11 月　30 日　The Journal of Medical Investigationに受理済

要旨　本論文では、*Vibrio vulnificus*が産生する細胞外小胞が細胞死を伴わない細胞剥離作用を誘導することを明らかにした。*V. vulnificus*は温暖な水生環境下に生息する好塩性のグラム陰性菌であり食中毒の原因菌として知られているが、海産物を介した経口感染の他に、傷口に接触することで生じる創傷感染の原因菌としても知られている。*V. vulnificus*感染は下痢、嘔吐、腹痛などの症状を引き起こすが、慢性肝疾患や免疫不全などの基礎疾患を持つ患者では壊死性筋膜炎や原発性敗血症を発症し重症化することが多く、高い致死率を有する。急速に病態が進行するため、病原性機序を解明することが重要であると考えられている。過去の研究では、*V. vulnificus*の主な毒性因子として、細胞質溶解ヘモリジン（VvhA）、多機能サイトトキシン（RtxA1）等が同定されているが、これらの病原因子が輸送されるメカニズムと急性敗血症との間の関連性は明らかとなっていない。グラム陰性菌が産生する細胞外小胞（OMVs：Outer membrane vesicles）は様々なグラム陰性菌において毒素の輸送に関与しているとの報告があるが、*V. vulnificus*が産生するOMVs（Vv-OMVs）の病原性や性質に関する研究はほとんど実施されていない。そのため本論文では、Vv-OMVsの性質に関する解析を行い、*V. vulnificus*の病原性機序との関連性を明らかにすることを目的とした。
　*V. vulnificus*及び採取したOMVsをヒト小腸上皮細胞株INT407に作用させ、数時間後の細胞形態の変化及び乳酸脱水素酵素（LDH）の放出を評価した。*V. vulnificus*感染時において高いLDH放出を伴う細胞死の誘導を確認した一方、OMVsを添加した細胞では、LDH放出を伴わない細胞の剥離反応が認められた。VvhAやRtxA1を欠損した*V. vulnificus*株由来のOMVsでも同様の細胞剥離が認められたことから、既知の毒性因子以外のタンパク質が関与している可能性を示した。加えて、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いた実験から、セリンプロテアーゼ様の作用を有するタンパク質が関与している可能性を示した。さらに液体クロマトグラフィー質量分析でVv-OMVsに内包されるタンパク質について網羅的に解析を行った結果、42種類のVv-OMVsに特徴的なタンパク質を見出すことに成功した。Vv-OMVsによる細胞剥離は処理後短時間で効果が認められることから、Vv-OMVsに含まれるタンパク質のうちセリンプロテアーゼ様の機能を有するものが周囲の細胞との接着を阻害し、全身性かつ急速な病態形成に寄与していると考えられた。本論文は、*V. vulnificus*感染の病態形成にOMVsが関連していることを示唆する重要な知見であると考えられたため、博士(栄養学)に値するものと判定した。