

令和元年6月25日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09955

研究課題名(和文) 野兔病菌の感染防御に必要な不可欠な宿主遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of host genes required for the protection against a lethal infection of *Francisella tularensis*

研究代表者

宇田 晶彦 (UDA, AKIHIKO)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：80392322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：野兔病は、グラム陰性の細胞内細菌である野兔病菌によって引き起こされる人畜共通感染症である。これまでに、ftt_0965c(亜硫酸イオンエクスポーター)遺伝子を欠損した野兔病菌ftt_0965c株は、マウス致死モデルにおいて良好なワクチン効果を示すことを明らかにした。そこで本研究では、野兔病菌強毒SCHU P9株の接種後に誘導される免疫反応を、免疫群と非免疫群マウス肺におけるマイクロアレイ解析および免疫組織染色解析を用いて比較した。これらの結果から、Iba1陽性マクロファージによって産生されるリポカリン2およびGBPが、野兔病菌の致死感染を回避するために必要不可欠である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、野兔病菌の病原性に関する研究は、野兔病菌が保持する遺伝子に注目されてきた。本研究は、野兔病菌の高い感染性や病原性を抑制可能な感染宿主遺伝子を同定することにより、弱毒化機序が明確で安全な野兔病菌ワクチンを開発するための基礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：Tularemia is a severe and sometimes fatal zoonotic disease caused by the Gram-negative intracellular bacterium *Francisella tularensis*. *F. tularensis* SCHU P9 derived ftt_0965c strain lacking the ftt_0965c (sulfite exporter) gene conferred stable and good protection in a mouse lethal model. In this study, the immune responses of mice vaccinated with and without ftt_0965c strain after the challenge of virulent *F. tularensis* SCHU P9 were compared by microarray and immunohistochemical analysis. These findings suggested that lipocalin 2 and GBP produced by Iba1-positive macrophages would be indispensable for the protection against lethal infection by *F. tularensis*.

研究分野：細菌学

キーワード：野兔病菌 野兔病 ワクチン 感染防御 免疫反応 LCN2 GBP Iba1陽性マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は、ヒトや動物に対して非常に高い感染性と致死性を有する細胞内寄生性グラム陰性桿菌で、日本および諸外国においてバイオテロ対策上重要性の高い菌の一つとして分類されている。野兔病菌の感染防御に最も有効な手段はワクチン接種である事が知られており、旧ソ連では弱毒生ワクチン RV 株、米国の一部では実験室のバイオハザード対策として弱毒生ワクチン LVS 株が使用されている。しかし、これらの生ワクチン株は人工培地継代によって得られた株であることから病原性復帰が容易に起こり得ると指摘されており、実際にそれを疑う様な事例も発生している。これらの事象を鑑みて、野兔病菌のワクチン開発を行うためには、宿主に対する弱毒化の機序を明確にする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

野兔病菌は哺乳類に対して極めて高い感染性と致死性を有し、生物テロに使用される可能性のある病原体として危惧されている。一方で、日本において野兔病菌のワクチン株は選定すら行われていない。これまでに、我々が作出した野兔病菌 *ftt_0965c* 遺伝子欠損株 (*ftt_0965c*) で免疫したマウスは、SCHU P9 株 (強毒株) の致死感染を完全に防御できる事を明らかにした。しかし、*ftt_0965c* 株を安全なワクチンとして利用するためには、宿主に対する弱毒化の機序を明確にする必要がある。そこで本研究では、*ftt_0965c* 株で免疫後に SCHU P9 株 (強毒株) を感染させたマウスにおいて、感染防御に必要な不可欠であった宿主遺伝子を、非免疫対照群と比較しながら同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野兔病菌株

野兔病菌強毒 SCHU P9 株および *ftt_0965c* 株は、化学組成培地 (CDM) を用いて 37 °C で 24 時間培養した。遠心により集菌した野兔病菌は、10%グリセロールを含む CDM に再浮遊させ、使用するまで -80 °C で保管した。野兔病菌の培養や感染実験等は、国立感染症研究所の BSL3 施設を内で実施した。

(2) マウスへの免疫及びチャレンジ実験

免疫群の C57BL/6J マウスは 3 種混合麻酔を腹腔内投与した後、 10^6 CFU/10 μ L の野兔病菌 *ftt_0965* 株を経鼻接種した。一方の非免疫群のマウスは、生理的食塩水を用いて、同様の処置を施した。免疫処置 3 週間後に、野兔病菌 SCHU P9 強毒株を 100 LD₅₀ (5000 CFU/10 μ L) の容量で経鼻接種した。強毒株接種後、マウスの生残確認および体重測定を毎日最長 3 週間実施し、重篤な症状と共に 25%以上の体重減少が確認された個体については、安楽殺を実施した。また、3 週間生残した個体についても、安楽殺を実施した。

(3) チャレンジ後の肺中サイトカイン濃度

免疫および非免疫群のマウス (N=8) に、半致死量の 100 倍 (100 LD₅₀) の強毒 SCHU P9 株を接種した 24 時間後に、安楽殺した。各々のマウスから採材した肺は、1 mL の RPMI 1640 培地と共にホモジネートした。ホモジネートしたサンプルに含まれる FGF basic、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP-1、TNF- α 、VEGF の濃度を測定するために、Mouse Cytokine Magnetic 20-Plex Panel (Life technologies) を用い、マニュアルに従ってサンプルを調整した。サイトカイン等の濃度は、Luminex MAGPIX (Biorad) を用い、マニュアルに従って測定した。

(4) マイクロアレイへのハイブリダイゼーション

免疫および非免疫群のマウス (N=8) は、100 LD₅₀ の強毒株を接種した 24 時間後に、マウスを安楽殺した。各々のマウスから採材した肺は、即座に RNAlater (Thermo Fisher Scientific) に浸し、使用するまで -80 °C で保管した。冷凍保管していた肺は室温に戻したのちに、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を精製した。精製した total RNA の濃度は ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) を用いて測定した。また、total RNA は Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent) を用いて解析し、すべての RNA の highest RNA integrity number (RIN) が 7 以上の高品質であることを確認した。total RNA (200 μ g/sample) は、low-RNA-input linear amplification kit (Agilent) を用いて、cRNA の増幅および Cy3 蛍光色素標識を行った。個々の cRNA サンプルは、gene expression hybridization kit (Agilent) に含まれる fragmentation buffer と blocking agent と混合し、60 °C で 30 分間断片化処理を行った。これらの標識済 RNA サンプルを、毎分 10 回転、65 °C、17 時間で SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8 \times 60K (Agilent) とハイブリダイゼーションさせた。マイクロアレイスライドを室温の wash solutions 1 (Agilent) および 37 °C に保温した wash solutions 2 (Agilent) で 1 回ずつ洗浄した。スライドを DNA

マイクロアレイスキャナー (Agilent) でスキャン、画像を Feature Extraction ソフトウェア (Agilent) を用いて解析し、遺伝子発現データファイルをエクスポートした。

(5) マイクロアレイのデータ解析

マイクロアレイから得られた遺伝子発現データには様々なエラーが含まれていることが知られている。これらの実験誤差を3段階 (バックグラウンドよりも低い値を持つデータの置換 (Data Transformation)、アレイ間補正 (Per Chip Normalization)、および遺伝子発現量の補正 (Per Gene Normalization)) に分けて補正するために、遺伝子発現データファイルを subioplatform64 にインポートした。補正したデータを用いて、強毒株感染および弱毒株感染マクロファージ間で有意に変動した遺伝子 (2倍以上、 $P < 0.05$) を抽出した。

(6) 免疫組織化学染色

安楽殺したマウスから採材した肺、脾臓、および肝臓は、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。固定したサンプルの病理組織検査、病理標本作製 (HE染色標本作製)、免疫組織化学染色標本作製は、札幌病理研究所 (札幌市) に委託した。

(7) リポカリン2発現抑制細胞を用いた感染実験

マウスのリポカリン2を発現抑制するために設計された29merのshRNA配列が組み込まれたレトロウイルスプラスミドは、Origene社より購入した。これらのshRNAを、マウスマクロファージ様細胞J774.1細胞へトランスフェクションした後、ピューロマイシンを含む培地で選択し、安定的に発現抑制されたマクロファージ様J774.1細胞を得た。ネガティブコントロールベクターをトランスフェクションおよびピューロマイシンで選択したマクロファージ様J774.1細胞も、同様に得た。これらの細胞は野兎病菌強毒性SCHU P9株および野兎病菌弱毒SCHU P5株と1時間インキュベートし、PBSで洗浄後した。これらの細胞はゲンタマイシンを含む培地で1時間インキュベートし、細胞外の生菌を除去した。更にPBSで洗浄後、10%FBSを含むRPMI 1640培地で規定時間培養した。最初の菌感染2時間後および26時間後に細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた菌量を計測した。これらの実験は、4連で実施した。

4. 研究成果

本研究では、免疫群と非免疫群における強毒株感染直後の免疫応答を比較することによって、野兎病菌の感染防御に必要な不可欠な宿主遺伝の同定を試みた。

(1) *ftt_0965c*株の感染防御効果

強毒株による致死的感染を効率よく回避できるワクチン候補株を検索した。これまで得られていたデータどおり、非免疫群のマウスは強毒株を経鼻接種した後、1週間以内に全ての個体が死亡したが、*pdpC*株を経鼻で免疫したマウスの半数は強毒株接種後3週間生存した。一方で、*ftt_0965c*株を経鼻で免疫したマウスは、強毒株による致死的感染を完全に防御し、全ての個体が3週間生存した (図1)。これらの結果から、以降の実験では、ワクチン株として*ftt_0965c*株を使用した。

(2) チャレンジ24時間後の誘導されるサイトカイン

*ftt_0965c*株を経鼻免疫した (免疫) 群と、生理的食塩水を接種した (非免疫) 群を用意し、免疫3週間後に100 LD₅₀の強毒SCHU P9株を経鼻接種した。強毒株をチャレンジ後24時間目に、安楽殺したマウスから肺を採材し、ホモジネートを作成した。これらの肺中に含まれるサイトカイン濃度を測定した結果、免疫群のマウスでは、マクロファージ等の抗原提示細胞を誘引するIL-12、IP-10、MIG、VEGFの有意な上昇 ($P < 0.05$) が確認された (図2)。一方で、それ以外のサイトカイン (FGF、GM-CSF、IFN、IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、KC、MCP-11、

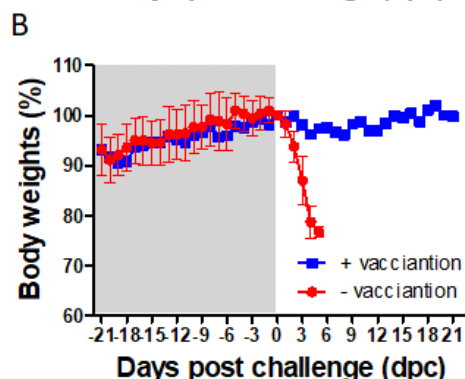
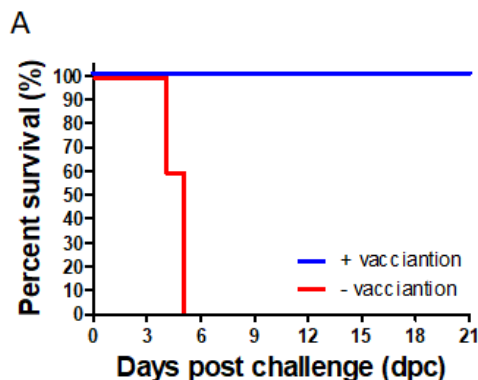


図1 Δ *ftt_0965c*免疫群と非免疫群のマウスにおける強毒株チャレンジ後の生存率 (A) および体重変動 (B)

MIP-11、TNF)において、肺中濃度に差はみられなかった。

(3) マイクロアレイ解析

強毒株チャレンジ 24 時間後の *ftt_0965c* 株免疫群および非免疫群のマウス肺から抽出した total RNA、および SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ (8 アレイ × 60,000 遺伝子/スライド) を用いて、網羅的遺伝子発現の比較解析を行った。得られた遺伝子発現データは、バックグラウンド補正 (data transformation)、マイクロアレイ間の発現強度補正 (per chip normalization)、および遺伝子発現量の補正 (Per Gene Normalization) を行った。強毒株チャレンジ後に免疫群および非免疫群間で有意に変動した遺伝子を同定するために、1.5 倍以上の発現量差および統計学的に有意に変動した遺伝子を抽出した (図 3)。この結果、有意に変動していた全ての 168 遺伝子は、ワクチン接種群で有意に発現上昇していることが確認された。また、有意に変動していた遺伝子の約 1 割を占める GBP (p65 guanylate-binding protein) は、既に野兎病菌の感染防御に必要な宿主因子候補として報告されていた。更に、本研究では、抗菌活性を持つことで知られているリポカリン 2 について注目した。

(4) チャレンジ 24 時間後に発現上昇していた遺伝子の内訳

ftt_0965c 免疫群と非免疫群で有意に発現変動していた 168 遺伝子について、Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) を用いて解析を行った。これらの遺伝子は、Antigen presentation ($P=1.16E-12$)、Interferon Signaling ($P=5.83E-11$)、Th1 Pathway ($P=7.85E-07$)、Th1 and Th2 activation Pathway ($P=6.31E-06$)、Allograft rejection signaling ($P=1.74E-5$)等の既存のパスウェイと強い相関があることが明らかとなった。また、免疫群と非免疫群で有意に変動した遺伝子を制御する因子として、STAT1 ($P=1.30E-53$)、IRF7 ($P=7.89E-49$)、TRIM24 ($P=3.38E-46$)、IFNG ($P=1.64E-43$)、IFNB1 ($P=1.42E-35$)、IFNAR ($P=3.01E-34$)、STAT3 ($P=5.33E-32$)、IRF3 ($P=1.18E-31$)、IRF1 ($P=5.15E-28$)等が関与している可能性が示唆された。更に、既知の遺伝子やタンパク質の直接的な相互作用に基づき、変動していた 168 遺伝子について、その相互作用をネットワーク作成したところ、STAT2、STAT3、IRF1、HLA がネットワークの中心を占めた (図 4)。

(5) リポカリン 2 発現抑制細胞における野兎病弱毒株の増殖能試験

リポカリン 2 の発現抑制細胞において、野兎病菌弱毒 SCHU P5 株は有意に高い生育能を示した (図 5)。一方で、強毒 SCHU P9 株を接種した場合には、リポカリン 2 発現

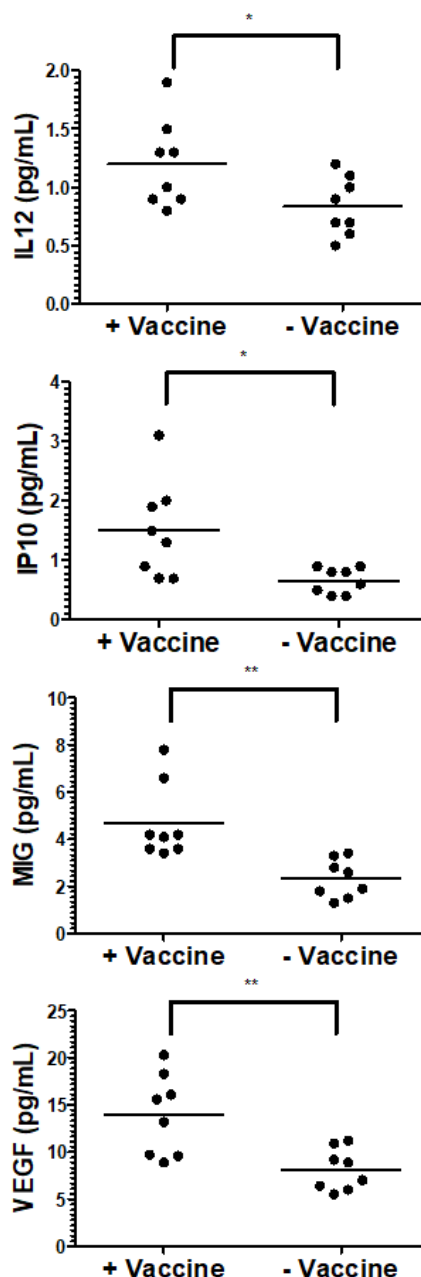


図2 免疫群と非免疫群のマウスにおける強毒株チャレンジ24時間後の肺中サイトカイン濃度

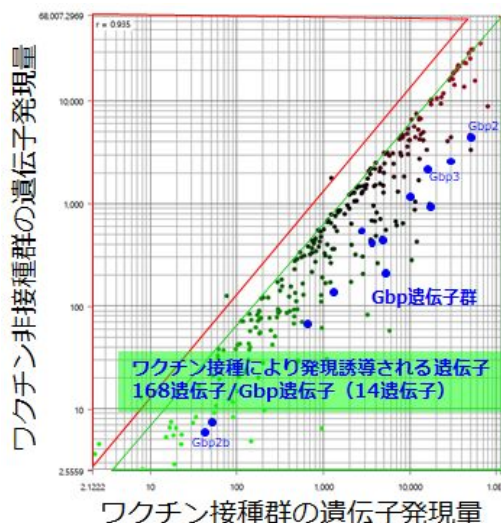


図3 強毒株チャレンジ24時間後の免疫および非免疫マウス肺における遺伝子発現比較解析

抑制細胞およびコントロール細胞における感染 26 時間後の生菌数に差は生じなかった。

(6) 免疫組織化学染色

強毒株接種後 24 時間後の免疫群と対照群のマウスから、肺、脾臓、肝臓を摘出し、病理学的解析を行った。肝臓及び脾臓においては、免疫群と対照群で顕著な差はみられなかったが、免疫群の肺では Iba1 陽性マクロファージの気管支および血管周囲への集積像が顕著に認められ、免疫応答に差異が生じている可能性が示唆された。

以上の結果から、これらの結果から、Iba1 陽性マクロファージによって産生されるリポカリン 2 および GBP (p65 guanylate-binding protein) が、野兔病菌の致死感染を回避するために必要不可欠である可能性が示唆された。

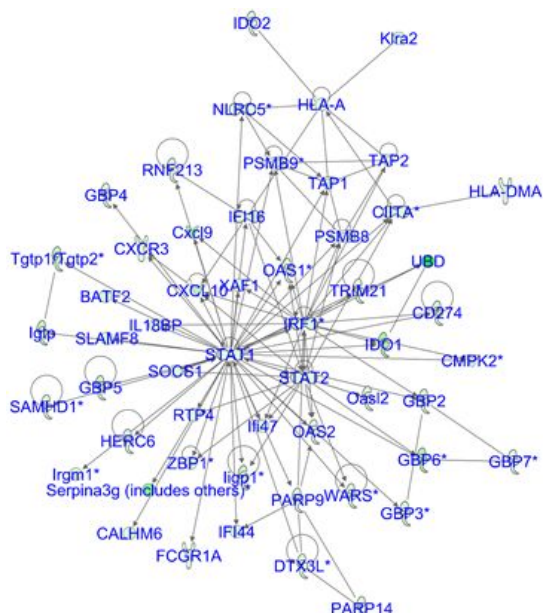


図4 強毒株チャレンジ24時間後に有意に発現上昇していた遺伝子の相互作用図

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Tian D, Uda A, Ami Y, Hotta A, Park E-s, Nagata N, et al. Protective effects of the Francisella tularensis pdpC mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in Cynomolgus macaques. Sci Rep. 2019;9(1):9193. doi: 10.1038/s41598-019-45412-8.
- (2) Tian D, Uda A, Park ES, Hotta A, Fujita O, Yamada A, et al. Evaluation of Francisella tularensis DeltapdpC as a candidate live attenuated vaccine against respiratory challenge by a virulent SCHU P9 strain of Francisella tularensis in a C57BL/6J mouse model. Microbiol Immunol. 2018;62(1):24-33. 査読有. 10.1111/1348-0421.12555.
- (3) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, et al. Pullulanase Is Necessary for the Efficient Intracellular Growth of Francisella tularensis. PLoS One. 2016;11(7):e0159740. 査読有. 10.1371/journal.pone.0159740.

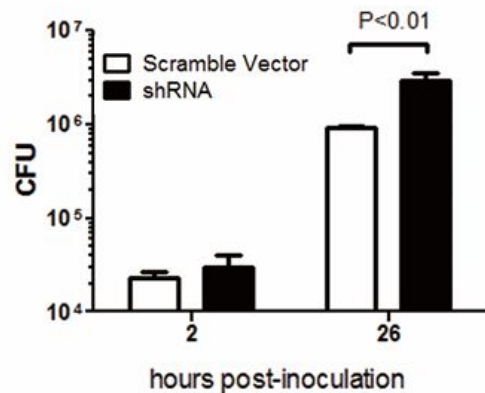


図5 リポカリン2発現抑制細胞における野兔病弱毒株の増殖能

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 野兔病菌の安定性と不活化に関する包括的な検討. 宇田晶彦, 阿崎美佳, 田徳雨, 中里勝芳, 堀田明豊, 森川茂. 第 18 回日本バイオセーフティ学会 総会・学術集会. 新宿
- (2) 野兔病菌の不活化条件に関する調査. 阿崎美佳, 宇田晶彦, 田徳雨, 堀田明豊, 森川茂, 森川茂. 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018 年 9 月. つくば
- (3) 阿崎美佳, 宇田晶彦, 中里勝芳, 田徳雨, 堀田明豊, 藤田修, 森川茂, "野兔病菌強毒株および弱毒株感染マクロファージの免疫応答に関する検討," 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年 9 月. 鹿児島
- (4) Deyu T, Uda A, Park ES, Hotta A, Fujita O, Yamada A, Hirayama K, Hotta K, Koyama Y, and Morikawa S, "Evaluation of a Novel Francisella Tularensis Live Attenuated Vaccine Candidate in C57bl/6j Mouse Model," XVth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, July 2017. シンガポール
- (5) Uda A, "Update on epidemiology and diagnostic approaches of Francisella tularensis" Workshop The development of the rapid molecular test kits for detecting pathogens of importance for human and animal health, May 2017. 山東省

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0208519/>

6．研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：田徳雨、阿崎美佳
ローマ字氏名：Tian Deyu、Azaki Mika

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。