

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19131

研究課題名(和文)百日咳菌の感染成立機構の解明とワクチン開発への応用

研究課題名(英文)Elucidation of infection establishment of *Bordetella pertussis* and application for the vaccine development

研究代表者

平松 征洋(Hiramatsu, Yukihiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90739210

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)：百日咳はワクチンで発症・重症化を予防できる疾患であるが、現行ワクチンでは百日咳の感染そのものを防ぐことはできない。この原因として、百日咳の感染成立機構が解明されていないことが挙げられる。申請者は、百日咳菌をヒト上気道の体温(30℃)で培養した場合にのみ強く発現するタンパク質BipAに着目し、その機能を解析した。BipA欠損株を用いた実験により、BipAは百日咳菌の細胞接着に重要な因子であることが判明した。さらに、現行のワクチン抗原に加えて、BipAを含む新規ワクチンの作製に成功した。また、国内臨床分離株のBipA発現を解析する過程で、BvgAS二成分制御系に変異を持つ株を世界で初めて発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

百日咳はワクチン予防可能疾患とされているが、ワクチンが普及した日本や欧米においても感染制御に苦慮する状況が続いている。この問題を解決するために、百日咳菌の感染成立機構を解明するとともに、現行ワクチンを感染防御能を持つものに改良する必要がある。本研究では、BipAが百日咳菌の細胞接着因子であることを実証するとともに、BipAを抗原として含む新規百日咳ワクチンの作製に成功した。本成果は、日本において年間数千人が報告される百日咳患者を減らすための有益な基礎データとなる。また、本研究の過程で発見した主要抗原を産生しない百日咳菌株はワクチンが無効である可能性が高く、今後の流行を監視していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Current acellular pertussis vaccine protect against disease but fail to prevent infection and transmission of *Bordetella pertussis*, which is epidemiological agent of pertussis (whooping cough). This causes that detailed infection mechanisms of the bacterium are well not understood. To resolve the problem, I focused on *Bordetella* intermediate protein A (BipA) that is strongly expressed in *B. pertussis* grown on upper airway temperature (30°C), and analyzed its function. The experiment using BipA-deficient mutant of *B. pertussis* demonstrated that BipA plays a role in bacterial adhesion to human lung cell line. Furthermore, I generated a novel pertussis vaccine that contains not only current vaccine antigens, but also BipA. In addition, I found a *B. pertussis* isolate not expressing major virulence factors due to impaired function of BvgAS system in the course of this study.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 ワクチン BipA バイオフィルム

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 百日咳の現状

百日咳は主に百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の感染によって起こる呼吸器感染症であり、乳児が罹患すると肺炎や呼吸困難などを合併し、重篤となる危険性が高い。ワクチンの導入により患者数は抑えられているが、我が国の百日咳患者数は年間1,500~6,500人と高い割合で推移しており(国立感染症研究所、IDWR)特に乳児患者では約半数が呼吸管理のために入院を必要としているとの報告もある(厚生省科研費・文献番号201447020A)。また、世界的に見ても、発展途上国だけでなく多くの先進国において百日咳患者数は増加傾向にあり、再興感染症の一つに挙げられている。このような背景から、百日咳に対する対策はいまだ公衆衛生上の重要な課題の一つとなっている。

百日咳の感染制御に苦慮する原因として、百日咳菌のヒト呼吸器への感染成立機構がほとんど解明されていないこと、現行ワクチンは百日咳の発症・重症化を防ぐことはできるが感染そのものを防ぐことはできないことが挙げられる(Warfel et al, PNAS. 111(2):787-792, 2014)。したがって、これまでに明らかにされていない百日咳菌の感染成立に必要な因子を特定し、その因子を感染防御抗原として含むワクチンを創出することで、百日咳菌の感染を防ぐことが可能となる。

(2) 百日咳菌の二成分制御系とBipAの発現

百日咳菌は多様な病原因子を産生しており、その発現は環境応答システムであるBvgAS二成分制御系によって調節されている。図1に示すように、百日咳菌をヒトの深部体温(37℃)で培養した場合、百日咳毒素(pertussis toxin: PT)や繊維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin: FHA)などの毒素・接着因子を強く発現し、宿主に対して病原性を示す(Bvg⁺ phase)。一方、低温で培養した場合、病原因子の発現が抑えられ宿主外の環境に適応すると考えられている(Bvg⁻ phase)。Bvg-intermediate(Bvgⁱ) phaseはこれらの中に位置しており、感染の成立に寄与する可能性が示唆されているが、その役割は十分に理解されていない。

百日咳菌の感染成立に必要なとされるBvgⁱ phaseでは主に接着因子が強く発現しており、その中で、*Bordetella intermediate protein A* (BipA)はBvgⁱ phaseでのみ強く発現するタンパク質として特定された(図1)

(Stockbauer et al, Mol Microbiol. 39(1):65-78, 2001)。BipAは百日咳菌の感染成立に寄与する可能性が高く、同時に、百日咳菌に対する感染防御抗原として有用であると予想される。しかし、現行の精製百日せきワクチンはBvg⁺ phaseで培養した百日咳菌の上清から製造されるため、BipAを含有していないと考えられる。現行ワクチンの主要抗原であるPTおよびFHAとともにBipAを含むワクチンを創出できれば、百日咳の発症・重症化を防ぐだけでなく、感染を防ぐことができると考えられる。

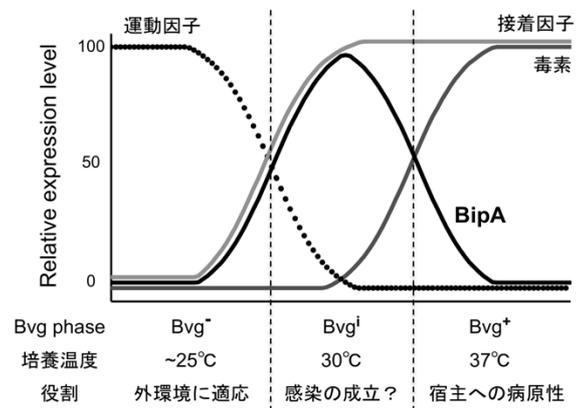


図1 Bvg phaseと病原因子の発現の関係

(3) 百日咳菌のバイオフィーム形成とBipAの発現

百日咳菌は感染成立後にバイオフィームを形成し、長期にわたり呼吸器に定着する(Conover et al, Mol Microbiol. 77(6):1439-1455, 2010)。バイオフィーム形成の前後ではタンパク質の発現パターンが変化することも知られており、BipAの発現量はバイオフィーム形成に伴い増加することが明らかとなっている(de Gouw et al, Emerg Microbes Infect. 3(1):1-9, 2014)。これらの知見は、BipAが百日咳菌の感染成立だけでなく、長期間にわたる呼吸器への定着にも関与することを示唆するが、その寄与度は不明である。BipAが初期感染および持続感染という異なるステージで機能するのであれば、BipAの性質を理解することが百日咳菌のヒトへの感染機構を解明する上で非常に重要となる。加えて、BipAが百日咳菌のバイオフィーム形成に必須の因子であれば、感染防御抗原としてだけでなく、バイオフィーム形成を抑制することのできるワクチン抗原としても有用である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BipAの機能解析を通じて百日咳菌の感染成立機構の解明を目指すとともに、BipAが百日咳に対する新規ワクチン抗原として有用であることを実証することにある。本研究では、百日咳菌のBipA欠損株を作製し、ヒト肺由来培養細胞株への接着率、マウス呼吸器への感染能、バイオフィーム形成能を親株(BipA発現株)と比較することで、BipAの機能解析を試みた。さらに、BipAの感染防御抗原としての有用性を検証するとともに、BipAを含む精製百日せきワクチンの創出を行った。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌の国内流行株における BipA の発現

国立感染症研究所で保有する 416 株の国内臨床分離株 (1982~2016 年に分離) を用いて、現在流行している (または過去に流行した) 百日咳菌株が BipA を発現していることを確認した。5 mM MgSO₄ の存在下で百日咳菌は Bvgⁱ phase を示すため、5 mM MgSO₄ を含む Bordet-Gengou (BG) 培地で培養した菌の抽出液を調整し、ウエスタンブロットおよび ELISA を用いて BipA を検出した。本実験では、大腸菌で産生・精製した recombinant BipA を Balb/c マウスに免疫し、得た抗血清を抗 BipA 抗体として使用した。

(2) BipA 欠損株の細胞接着能、マウスへの感染能、バイオフィーム形成能

相同組換え (double cross-over 法) により、百日咳菌 Tohama 株 (ワクチン株) のゲノム上の *bipA* 遺伝子を欠失する BipA 欠損株を作製した。この BipA 欠損株および親株を 5 mM MgSO₄ の存在下 (Bvgⁱ phase) または非存在下 (Bvg⁺ phase) で培養し、ヒト由来細胞株 A549 に感染させ、細胞に接着した菌の生菌数 (colony forming unit: CFU) を測定した。また、これらの菌株を C57BL/6 マウスに経鼻感染させ、4 日後のマウスの気管および肺内に定着した百日咳菌の CFU を測定した。BipA 欠損株のバイオフィーム形成能は、ポリスチレンチューブ中で培養し、気液界面に形成されたバイオフィームをクリスタルバオレットで染色後、吸光度を指標に定量することで評価した。

(3) BipA を含む精製百日せきワクチンの作製

百日咳菌 Tohama 株を Stainer-Scholte (SS) 液体培地を用いて培養し、その途中で 5 mM MgSO₄ を加えることにより、PT、FHA、BipA を含む培養上清を得た。PT、FHA、BipA に含まれる量は、ウエスタンブロットにより解析した。この上清を濃縮後、エンドトキシン除去、ホルマリン処理を施し、実験室レベルでの百日せきワクチンとした。本ワクチンと水酸化アルミニウムアジュバントを Balb/c マウスに免疫し、血清中の抗 BipA 抗体の産生を ELISA を用いて確認した。また、日本国内で製造されている 3 社の 4 種混合ワクチン (ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ) についても同様に検討した。

(4) BipA の免疫による百日咳菌感染防御効果

recombinant BipA を不完全フロイントアジュバントとともに免疫した Balb/c マウスに百日咳菌 Tohama 株を経鼻感染させ、4 日後のマウス気管内に定着した菌の CFU を測定した。なお、百日咳菌感染前に血清を回収し、抗 BipA 抗体が産生されていることを確認した。

4. 研究成果

(1) 百日咳菌の国内流行株における BipA の発現

解析に供した百日咳菌 416 株のうち、414 株が BipA を発現していた。この結果は、BipA を含むワクチンが国内で流行している菌株に対して感染防御効果を有する可能性を示している。一方、BipA を発現していない 2 株は主要病原因子である PT、FHA も発現していなかったことから、BvgAS 二成分制御系を構成する遺伝子の解析を進めたところ、1 株は *bvgS* 遺伝子の 955 番目のシトシンがアラニンに変異したことで、BvgS タンパク質の 319 番目のプロリンがスレオニンに変異していた。残りの 1 株は、197 番目のシトシンと 198 番目のグアニンの間にシトシンの一塩基挿入があり、フレームシフトの結果、終止コドンが新生されていた。これらの BipA 非発現株に、野生型の *bvgA* および *bvgS* 遺伝子をプラスミドを用いて導入した結果、BipA、PT、FHA のすべてが他の百日咳菌株と同等の発現量を示した。BvgAS 二成分制御系に変異を持つ百日咳菌はこれまで臨床分離されておらず、本研究が世界で初めての報告となった。さらに、BvgS の 319 番目のプロリンが BvgAS 二成分制御系の機能に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(2) BipA の機能解析

BipA 欠損株の細胞接着能

Bvgⁱ phase で培養した BipA 欠損株は、親株 (BipA 発現株) と比較し、A549 細胞への接着能が有意に低かった。一方、Bvg⁺ phase で培養した場合、BipA 欠損株と親株の細胞接着能は同程度であった。本結果は、BipA が百日咳菌の感染成立において必要となる Bvgⁱ phase において、細胞接着因子として機能することを示している。

BipA 欠損株のマウスへの感染能

Bvg⁺ phase および Bvgⁱ phase のどちらで培養した場合においても、BipA 欠損株と親株を感染させたマウスの気管および肺内における生菌数に差は見られなかった。この結果は、BipA が百日咳菌のマウスへの感染に関与しないことを示しており、ヒト由来細胞株を用いた (2) で得られた結果とは異なるものであった。百日咳菌はヒトのみを宿主とするため、ヒト由来細胞とマウスを用いた実験で異なる結果が得られた可能性がある。

BipA 欠損株のバイオフィルム形成能

Bvgⁱ phase で培養した BipA 欠損株は、親株と比較し、高いバイオフィルム形成能を有していた。一方、Bvg⁺ phase で培養した場合、BipA 欠損株と親株のバイオフィルム形成能は同程度であった。事前の予測とは異なり、本結果は、Bvgⁱ phase において BipA がバイオフィルム形成を抑制する因子として機能することを示している。

(3) BipA を含む精製百日せきワクチンの作製

PT、FHA、BipA を最大限含む上清は、下記の培養条件で得られた。BG 培地で培養した百日咳菌 Tohama 株を OD₆₅₀=0.1 となるように SS 培地で調整し、36、24 時間前培養した。前培養菌を OD₆₅₀=0.003 となるように SS 培地で調整し、ルービン中、36 で培養した。48 時間後、最終濃度が 5 mM となるように MgSO₄ を添加し、さらに 120 時間、36 で培養した。遠心後、得られた上清より作製したワクチンをマウスに免疫した結果、血清中に抗 PT 抗体、抗 FHA 抗体、抗 BipA 抗体の産生が確認された。一方、国内で製造されている 4 種混合ワクチンのうち、ある 1 社のワクチンを免疫したマウスにおいて、抗 BipA 抗体が産生されていた。この結果から、すでに流通しているワクチンの中に抗原として BipA が含まれているものがあることが明らかとなった。

(4) BipA の免疫による感染防御効果

recombinant BipA を免疫したマウスでは、血清中に抗 BipA 抗体の産生が誘導された。しかし、PBS を免疫したマウス（コントロール）と比較し、百日咳菌の気管内における生菌数に差は見られなかった。したがって、BipA の免疫には、百日咳菌に対する感染防御効果がないことが示された。

(5) 統括

本研究の成果から、BipA が百日咳菌のヒト細胞への接着に重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方、マウスへの感染やバイオフィルム形成を促進する効果は見られなかった。今後、百日咳菌の感染成立機構を解明するためには、他の動物モデルを用いたさらなる BipA の機能解析が必要と考えられる。

また、本研究では、当初予期していなかった発見として、BvgS の 319 番目のプロリンが BvgAS 二成分制御系が機能するために必須であることを明らかにした。さらに、BvgAS 二成分制御系に変異を持ち、主要病原因子である PT および FHA を産生しない百日咳菌株の存在を示した。PT、FHA は主要なワクチン抗原でもあることから、本研究で発見した *bvgS* 変異株は現行ワクチンが無効である可能性が高い。したがって、このようなワクチン抗原を産生しない百日咳菌株のサーベイランスを実施していく必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

[Hiramatsu Y](#), Sakamoto D, Satho T, Irie K, Miake F, Maeda M, Kashige N. *Lactobacillus plantarum* induces genomic DNA-dependent and TLR9-mediated elafin secretion from Caco-2 cells. *Asian Pac J Allergy Immunol*. In press 査読有
DOI: 10.12932/AP-021017-0174.

Zomer A, Otsuka N, [Hiramatsu Y](#), Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, Poolman J, Geurtsen J. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccine. *Microb Genom*. In press 査読有
DOI: 10.1099/mgen.0.000180.

Fukui-Miyazaki A, Toshima H, [Hiramatsu Y](#), Okada K, Nakamura K, Ishigakia K, Shinzawa N, Abe H, Horiguchi Y. The eukaryotic host factor 14-3-3 inactivates adenylate cyclase toxins of *Bordetella bronchiseptica* and *B. parapertussis*, but not *B. pertussis*. *mBio*. 9(4). pii: e00628-18 (2018) 査読有
DOI: 10.1128/mBio.00628-18.

[Hiramatsu Y](#), Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. *Emerg Infect Dis*. 23(4):699-701 (2017) 査読有
DOI: 10.3201/eid2304.161575.

[Hiramatsu Y](#), Yoshino S, Otsuka N, Shibayama K, Watanabe M, Kamachi K. The proline residue at position 319 of BvgS is essential for BvgAS activation in *Bordetella pertussis*. *Pathog Dis*. 75(1):ftx011 (2017) 査読有
DOI: 10.1093/femspd/ftx011.

Moriuchi T, Toda K, [Hiramatsu Y](#), Otsuka N, Shibayama K, Kamachi K. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. *Int J Infect Dis*. 62:56-58 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.015.

Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: qualitative and quantitative analyses. *PLoS One*. 12(7):e0181181 (2017) 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0181181.

Kamachi K, Moriuchi T, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Microbiol Methods*. 133:20-22 (2017) 査読有

DOI: 10.1016/j.mimet.2016.12.009.

Hiramatsu Y, Saito M, Otsuka N, Suzuki E, Watanabe M, Shibayama K, Kamachi K. BipA is associated with preventing autoagglutination and promoting biofilm formation in *Bordetella holmesii*. *PLoS One*. 11(7):e0159999 (2016) 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0159999.

Uyeda S, Sharmin T, Satho T, Irie K, Watanabe M, Hosokawa M, Hiramatsu Y, Nakashima Y, Kashige N, Toda A, Mishima K, Miake F. Enhancement of the production of specific antibodies to OVA and Ag85B by myrcene in mice. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 34(4):314-323 (2016) 査読有

DOI: 10.12932/AP0734.

[学会発表](計6件)

坂本大輔、平松征洋、萩原大樹、佐藤朝光、入江圭一、前田稔、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広、*Lactobacillus plantarum* D2905 株の EPS の産生に関わる遺伝子の同定とその性状、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月

小野田直記、平松征洋、照屋志帆乃、鈴木孝一郎、堀口安彦、百日咳菌の V 型分泌装置 Vag8 の機能的解析、第 71 回日本細菌学会関西支部総会、2018 年 10 月

小野田直記、平松征洋、照屋志帆乃、鈴木孝一郎、堀口安彦、Functional analysis of *Bordetella pertussis* autotransporter, Vag8、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月

大塚菜緒、平松征洋、柴山恵吾、蒲地一成、Construction of a novel vaccine strain *Bordetella pertussis* Tohama co-producing Fim2 and Fim3、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月

坂本大輔、佐藤朝光、平松征洋、入江圭一、中島幸彦、前田稔、鹿志毛信広、見明史雄、クルマエビの腸管から単離された乳酸菌のゲノム解析、日本薬学会 第 138 年会、2018 年 3 月

森内巧、文元礼、品川文乃、新谷亮、宮地悠輔、勝田友博、大塚菜緒、平松征洋、柴山恵吾、蒲地一成、わが国の小児と成人における百日咳抗体の量的・質的解析、第 48 回日本小児感染症学会、2016 年 11 月

[その他]

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/LabWeb/>

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。