

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17027

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染に伴う細菌性肺炎の重症化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of exacerbation of bacterial pneumonia following influenza infection

研究代表者

小川 真理子(Ogawa, Mariko)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：20754732

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)：A型インフルエンザウイルス(IAV)による主な死因の一つは、肺炎球菌による細菌性肺炎の合併である。本研究では、細菌感染初期におけるIAV感染宿主-細菌間相互作用に着目し、小胞体局在シャペロンであるGP96がIAV感染に伴い、肺胞上皮細胞表面に誘導されることを見出した。IAV感染細胞への肺炎球菌の菌体付着量はウイルス非感染細胞と比較して有意に増加したが、GP96抑制剤の添加により非感染細胞への付着と同等レベルまで減少した。以上の結果から、IAV感染により上皮アピカル部位に表出したGP96は、肺炎球菌に対する宿主レセプターとして機能することにより菌体付着を亢進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウイルスと細菌が重複感染した宿主における複雑な病態形成機構を明らかにし、既存の治療法に代わる感染制御法の提案を目的として推進した。A型インフルエンザウイルス感染により気道上皮細胞に表出したGP96は細菌に対する宿主レセプターとして機能するが、GP96抑制剤の添加によりウイルス感染細胞への細菌の付着は抑制されることを証明した。したがって、ウイルス感染に伴い表在化するGP96は有効な感染防御標的分子であり、インフルエンザに重複する細菌性肺炎の新規感染制御法の開発に応用できると考える。

研究成果の概要(英文)：Influenza infection predisposes the host to secondary bacterial pneumonia, a major cause of mortality during influenza epidemics. Here, we found that epithelial cells in humans infected with the influenza A virus (IAV) exhibit GP96 on the cell surface, an endoplasmic reticulum chaperon for numerous cell surface and secreted proteins. The present findings showed that *Streptococcus pneumoniae* demonstrated a greater level of efficient adherence to IAV-infected alveolar epithelial cells as compared to non-infected cells, while that enhanced bacterial association was reduced by introduction of a pharmacological GP96 inhibitor. Together, our results offer insight regarding the mechanism for IAV-induced redistribution of GP96 on epithelial surfaces, which plays a critical role in secondary pneumococcal infection.

研究分野：細菌学

キーワード：インフルエンザウイルス 肺炎球菌 肺炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは冬期に流行する呼吸器感染症である。日本国内だけでも年間 1,000 万人が罹患し、約 10,000 人が重症肺炎により死亡する。重症のインフルエンザ症例における細菌性肺炎の合併は、原発性ウイルス性肺炎と比較して頻繁に起こり、インフルエンザ関連死の主な原因である (Chertow & Memoli, *JAMA* 309: 275, 2013)。実際、2009 年の A 型インフルエンザウイルス (H1N1) pdm09 流行時に実施された多数の疫学解析によっても、インフルエンザに合併する細菌性肺炎の危険性が再認識された。

インフルエンザに続発する細菌性肺炎の発症機構について、ウイルス感染がもたらす組織傷害と免疫応答が細菌感染への感受性を亢進させることが報告されてきた。これまでに、化膿レンサ球菌は肺胞上皮細胞に先行感染した A 型インフルエンザウイルス (IAV) のヘマグルチニンに結合することにより、肺組織に侵入し、増殖することが明らかになっている (Okamoto S. *et al. J Virol* 77: 4104, 2003; Okamoto S. *et al., Vaccine* 22: 2887, 2004)。しかし、重複感染初期段階における詳細な病態形成機構は明らかになっておらず、病因論に基づく有効な予防法と治療法の確立に至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスの先行感染による肺炎球菌の感染への感受性の亢進に着目し、ウイルス感染に伴い表在化する宿主分子の機能解析を行うことにより、分子標的治療法もしくは予防法への応用の基盤となる分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) IAV 感染に伴い表在化する宿主分子の検索

肺胞上皮細胞 (A549) に A 型インフルエンザウイルス (IAV) A/FM/1/47 株 (H1N1) を感染させた。感染細胞と非感染細胞の表層分子をビオチンで標識し、ストレプトアビジンビーズを用いた免疫沈降法と質量分析により、感染により発現量が変化する分子を同定した。

(2) 表在化宿主分子と相互作用する細菌表層タンパク質の検索

肺炎球菌 D39 株 (血清型 2 型) からムラミダーゼ処理により菌体表層画分を抽出した。組換え宿主タンパク質と反応する菌体表層分子を免疫沈降により回収し、質量分析による同定を行った。大腸菌で組換えタンパク質を作製し、ELISA、表面プラズモン共鳴 (SPR)、および共焦点レーザー顕微鏡観察により、宿主タンパク質との親和性と相互作用を確認した。

(3) IAV 感染細胞への細菌付着能の解析

A549 細胞に IAV を感染させ、36 時間後に肺炎球菌を感染させた。所定時間経過後に、細胞表層に付着した菌数をカウントし、付着能を評価した。

4. 研究成果

(1) GP96 はウイルス感染に伴い表在化し、細菌定着を亢進させる

IAV 感染細胞に表在化もしくは表層での発現量が増加する宿主分子群として、Glycoprotein 96 (GP96) に着目した。小胞体に局在する分子シャペロン GP96 は、C 型肝炎ウイルスやヒトヘルペスウイルスなどの感染により、Toll-like receptor (TLRs) やインテグリンとともにストレスタンパク質として細胞表層へ誘導される (Prusty *et al., PLoS one* 9: e113962, 2014; Kim *et al., PLoS one* 9: e96302, 2014)。マスターシャペロンとしてアピカル部位に表出した GP96 は、髄膜炎菌やリステリア菌などの病原因子に対するレセプターとなり、種々の細胞内シグナル伝達を誘導する (Cabanes *et al., EMBO J* 24: 2827, 2005; Rechner *et al., Cell Host & Microbe* 2: 393, 2007)。そこで、

IAV 感染により表在化する GP96 と細菌定着の関連を検証した。

GP96 阻害剤である PU-WS13 存在下もしくは非存在下において、A549 細胞に IAV を感染させ、36 時間後に肺炎球菌を感染させた。IAV 感染細胞への菌体付着量はウイルス非感染細胞と比較して有意に増加したが、GP96 阻害剤もしくは GP96 抗体の添加により非感染細胞への付着量と同等レベルまで減少した。また、IAV 感染細胞もしくは IAV-肺炎球菌の混合感染細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、二次的に感染させた肺炎球菌は表在化した GP96 発現部位に局在することを確認した。これらの結果から、IAV 感染に伴い上皮アピカル部位に表出した GP96 は肺炎球菌の付着因子に対する宿主レセプターとして機能する可能性が示唆された。

(2) 肺炎球菌は菌体表層分子 AliA と AliB を介して GP96 に結合する

表在化 GP96 と相互作用する細菌表層分子の検索を行った。肺炎球菌からムラミダーゼ処理により菌体表層画分を抽出した。組換え GP96 と反応する菌体表層分子を免疫沈降により回収し、質量分析による解析を行った結果、肺炎球菌の oligopeptide permease である AliA, AliB を同定した。AliA, AliB と GP96 の相互作用を ELISA および SPR で解析した結果、AliA, AliB は GP96 に高い親和性で結合することが示された。したがって、二次的に感染する肺炎球菌は、IAV 感染により細胞表層で異所発現した GP96 と菌体表層タンパク質 AliA, AliB の直接的な相互作用を介して、宿主肺胞上皮細胞に定着することが明らかになった。

(3) IAV 感染により表層での発現量が増加したインテグリン αV は肺炎球菌の宿主への付着を亢進させる

病原性レンサ球菌はフィブロネクチンやラミニンなどの細胞外マトリックスを介してインテグリンに結合し、宿主細胞に付着・侵入することが報告されている。そこで、IAV 感染細胞表層におけるインテグリン αV の発現に着目し、これが宿主レセプターとして機能する可能性を検証した。ウイルス感染細胞もしくは非感染細胞の表層タンパク質をビオチンで標識し、抗インテグリン αV 抗体およびプロテイン A をコートしたビーズを用いて免疫沈降を行った。その結果、インテグリン αV の細胞表層での発現量は IAV 感染に伴い明らかに増加することを見出した。GP96 はインテグリン αV の細胞表層での発現に重要なシャペロン分子である。GP96 は二量体を形成し、その C 末領域にクライアント分子が結合する。N 末のポケットに ATP が結合すると、活性型の Closed form に構造を変化させ、シャペロン分子としての機能を発揮することが知られている。そこで、GP96 の ATP 結合ポケットに作用し、そのシャペロン機能を阻害する GP96 阻害剤 PU-WS13 がウイルス感染細胞におけるインテグリンの表在化に及ぼす影響を検討した。その結果、IAV 感染細胞表層におけるインテグリン αV 発現は GP96 阻害剤存在下において、明らかに抑制されることを確認した。さらに、IAV 感染細胞への肺炎球菌の付着は抗インテグリン αV 抗体存在下において、コントロール抗体存在下と比較して、有意に抑制されることを示した。肺炎球菌は、インテグリン α サブユニットと RGD 配列を介して相互作用する Fn を分子ブリッジとして利用し、菌体表層に発現する Fn 結合タンパク質を介して、宿主細胞に付着・侵入することが知られている。RGD ペプチドもしくはコントロールペプチド存在下における IAV 感染細胞への肺炎球菌の付着を評価したところ、ウイルス感染細胞への肺炎球菌の付着量は RGD ペプチド存在下において有意に減少した。これらの結果から、二次的に感染する肺炎球菌は、IAV 感染により表在化した GP96 および GP96 のシャペロン機能依存的に表層での発現量が増加したインテグリン αV をレセプターとして宿主細胞に定着することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sumitomo T, Nakata M, Nagase S, Takahara Y, Honda-Ogawa M, Mori Y, Akamatsu Y, Yamaguchi M, Okamoto S, Kawabata S.	4. 巻 12
2. 論文標題 GP96 drives exacerbation of secondary bacterial pneumonia following influenza A virus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	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/mBio.03269-20	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 Ogawa T, Hirose Y, Honda-Ogawa M, Sugimoto M, Sasaki S, Kibi M, Kawabata S, Ikebe K, Maeda Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Composition of salivary microbiota in elderly subjects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-18677-0	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 Sumitomo T, Mori Y, Nakamura Y, Honda-Ogawa M, Nakagawa S, Yamaguchi M, Matsue H, Terao Y, Nakata M, Kawabata S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins is involved in the pathogenesis of cutaneous infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2018.00010	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本多-小川真理子, 住友倫子, Dalia Hamd, 毛利泰士, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠.
2. 発表標題 Involvement of two-component regulatory system TCS08 in pneumococcal pneumonia pathogenesis.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sumitomo T, Hamd DT, Honda-Ogawa M, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S.
2. 発表標題 Two-component regulatory system TCS08 contributes to pathogenesis in pneumococcal pneumonia.
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院歯学研究科口腔細菌学教室ホームページ
<https://web.dent.osaka-u.ac.jp/mcrbio/>

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
---------	---------