

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03485

研究課題名(和文)百日咳菌の咳誘発因子の機能解析と咳発作発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of paroxysmal cough in pertussis

研究代表者

堀口 安彦(Horiguchi, Yasuhiko)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00183939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌感染によって生じる咳発作の作用機序を解析した。これまでに研究代表者らが同定した咳発作に関わる3種類の百日咳菌由来分子(百日咳毒素(PTx)、Vag8、エンドトキシン(LOS))の役割を解析したところ、LOSが受容体のTLR4を介して炎症性メディエータのブラジキニン(Bdk)の生成を誘導すること、Vag8はBdk生成の負の制御因子C1エステラーゼインヒビターの作用を抑制してBdk生成を亢進させること、PTxはBdkが誘導する細胞内シグナルの負の制御を解除して下流の咳反射に関わる活動電位を発生させるイオンチャネルTRPV1の刺激感受性を亢進させ、激しい咳発作を起こすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により百日咳の咳発作のメカニズムが明らかとなった。その成果により、ブラジキニンやTRPV1の作用を阻害することなどによって、百日咳症の患者に多大な負担をかける咳発作に対する原因療法の開発に道が拓かれる可能性が示された。また、研究実施者らが開発したマウスの咳モデルは、咳誘発因子を必要としない覚醒状態の動物の咳を観察できるため、未だ不明な点が多い動物の咳反射メカニズムの解析に大いに役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the mechanism by which *Bordetella pertussis* causes severe paroxysmal coughing in host animals. We had previously identified the bacterial virulence factors, pertussis toxin, Vag8, and LOS, as causative agents for paroxysmal cough. Using a mouse coughing model in this study, we clarified that LOS, pertussis toxin (PTx), and Vag8 of the bacteria cooperatively function to cause coughing. Bradykinin induced by LOS sensitized a transient receptor potential ion channel, TRPV1, which acts as a sensor to evoke the cough reflex. Vag8 further increased bradykinin levels by inhibiting the C1 esterase inhibitor, the major downregulator of the contact system, which generates bradykinin. PTx inhibits intrinsic negative regulation systems for TRPV1 through the inactivation of Gi GTPases. Our findings provide a basis to answer long-standing questions on the pathophysiology of pertussis cough.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 百日咳毒素 Vag8 エンドトキシン 咳発作 ブラジキニン TRPV1

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌感染によって起こる特徴的な発作性咳嗽（咳発作）を伴う呼吸器感染症である。WHO によると年間約 20 - 30 万人の本疾患による死亡者が報告されている。主に発展途上国での乳幼児感染が最も問題視されているが、先進国においても乳幼児期に接種したワクチン効果の減弱した青年期の感染や、ワクチン成分と抗原性の異なる抗原変異株の出現で罹患者数が増加しており、いわゆる再興感染症の一つに挙げられている。

百日咳患者にはマクロライド系の抗生剤が第一選択薬として本菌の排除に使用されているが、我が国を含む世界各国でマクロライド耐性の本菌の分離が報告されており、米国疾病予防管理センター（CDC）は本菌の薬剤耐性化を潜在的脅威として注意を喚起している。また、百日咳の咳発作は患者に多大な負荷を強い、ときに死因のひとつとなるがその発症機構は不明で、そのため臨床現場では咳発作には対症療法を持って処置せざるを得ないのが現状である。原因療法開発の道を開くには、咳発作の発症メカニズムの解明が必須であるが、百日咳菌がヒトに特化した病原細菌であるため、咳発作を再現する動物モデルの作製が困難とされており、実際そのために咳発作の発症機構に関わる研究はほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

これまでの研究において、本研究代表者らは百日咳菌の病原性を解析する過程で、特定の系統のマウスが人工的な百日咳感染に应答して再現よく咳発作を起こすことを発見した（特許出願中：特願 2016-197288）。さらにこのマウスの咳モデルを活用して、百日咳菌由来の 3 種類の既知の分子（百日咳毒素（PTx）、Vag8、エンドトキシン（LOS））がマウスの咳発作に関与することを解明した。そこで本研究課題では、これまでの研究成果を基盤にして、感染動物の咳発作誘導における上記の 3 種の菌体成分の役割を解明し、咳発作の発症メカニズムの全体像の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) 百日咳菌株と培養

百日咳菌 18323 株は Bordet-Gengou 寒天培地あるいは Stainer-Scholte 液体培地で常法どおり培養した。百日咳菌変異株作製のための各遺伝子は PCR で増幅し、大腸菌の汎用宿主株でクローニング、同じく大腸菌 DH5α λpir 株を利用した三親接合法を用いて百日咳菌に導入し、相同組換えで遺伝子欠失あるいは置換したクローンを選択した。

(2) マウス咳の計数

6-10 週齢の C57BL6 系の雄マウスの鼻腔に種々の試料を麻酔下で投与し、任意の期間において 1 日に 5 分間、ビデオカメラでマウスの咳を記録した。記録した動画を実験の詳細を知らされない観察者が観察し、発咳音とマウスの姿勢から咳を判断して計数した。別途、一部の実験におけるマウスの発咳は全身プレチスモグラフ（容積計）で検出される特徴的な呼吸波形から同定した。観察者が計数した咳とプレチスモグラフにより検出した咳は、86.4-96.7%一致した。

(3) 百日咳菌病原因子

百日咳菌のリポオリゴサッカライド（LOS）は本菌 18323 株から熱フェノール法にて精製した。得られた標品の精製度およびエンドトキシン活性はそれぞれ SDS ポリアクリルアミド電気泳動後の銀染色像とリムルステストで確認した。百日咳菌 Vag8 と PTx は既報に従って精製した。

4. 研究成果

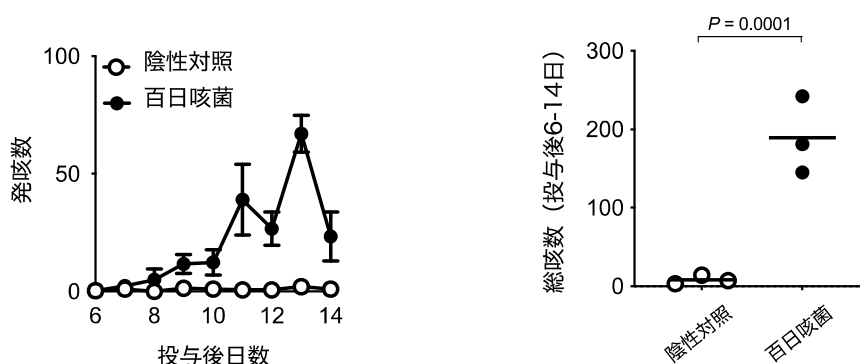


図 1：百日咳菌投与マウスの咳応答。咳数の経日変化（左）と投与後 6-14 日間の総咳数（右）を表す。

以前の研究において、C57BL/6 マウスに百日咳菌 18323 株 (5×10^6 CFU) を経鼻投与したところ、投与後約 1 週間後からマウスは明確な音声と発咳姿勢で確認できる咳症状を呈することがわかった (図 1)。同様の発咳は菌体破砕液 (50 μ g/マウス) を 5 日間連続で経鼻投与した場合も、最初の投与から 5 日目以降に認められた。臨床分離株を含めた種々の百日咳菌株で同様に咳発作惹起能を調べたところ、咳の頻度に差があるものの、いずれの菌株の投与でもマウスに咳応答を認めることができた。さらに各種の病原因子遺伝子を欠失した変異百日咳菌 18323 株を複製して、その破砕液を本マウスモデルの試験に供して解析を重ねたところ、最終的に本菌の LOS, Vag8, PTx が協調してマウスに咳を起こすことがわかった (図 2)。本研究課題では、それぞれの病原因子の咳発作惹起メカニズムにおける役割を解析した。

Vag8 はオートトランスポーターに分類される百日咳菌のタンパク質性病原因子のひとつである。百日咳菌の LOS は一般のグラム陰性細菌のリポポリサッカライド (LPS) に相当する。そこで LPS と LOS で基本構造が共通する lipid A 部分に着目して、大腸菌由来の lipid A を LOS に代えて Vag8, PTx とともに投与した場合も、咳応答が観察できた (図 2)。PTx 単独、PTx と Vag8 および LOS と Vag8 の組み合わせでは、発咳はほとんど起こらず、LOS と PTx の組み合わせでは菌体破砕液の 3 分の 1 程度の数の発咳が認められた。以上の結果から、LOS と PTx の作用によって咳応答が惹起され、Vag8 がこれを増悪させると考えられた。

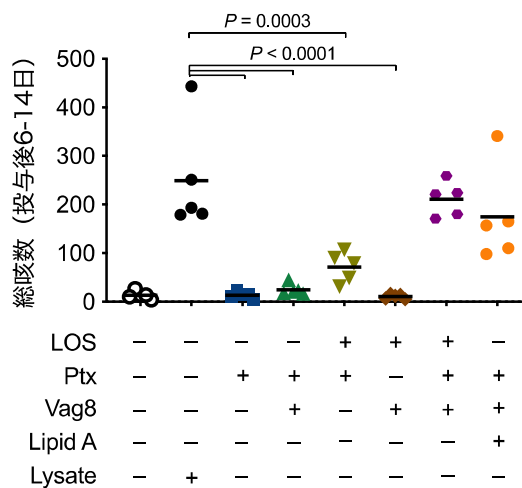


図 2: 百日咳菌成分の投与によるマウスの咳応答。

次に、LOS-Vag8-PTx の協調作用による咳反射刺激のメカニズムの解析を試みた。動物の

咳反射系路は多岐にわたっているため、あらかじめ系路を予測して解析を進めることは難しい。そこで、既知の咳反射系路を阻害する多種類の阻害剤を使用して、LOS-Vag8-PTx による咳応答が阻害される主要系路を探索した。その結果、ブラジキニン 2 型受容体 (B2R) の阻害剤と Transient Receptor Potential イオンチャネルのひとつである TRPV1 の阻害剤が、LOS-Vag8-PTx 投与によるマウスの咳応答を阻害することがわかった。B2R 阻害剤と TRPV1 阻害剤を同時に投与しても、LOS-Vag8-PTx による咳応答程度は単独の阻害剤投与の場合と同様であった。B2R は炎症性メディエーターのブラジキニンの受容体で、TRPV1 は温度や物理的・化学的の刺激に応答するセンサーとして知られており、咳反射に関わる神経線維の興奮伝導に関与し、その活性はブラジキニンによって制御を受けることが報告されている。そこで、ブラジキニンを生成しない Kng1 ノックアウトマウスや TRPV1 ノックアウトマウスに菌体破砕液や LOS-Vag8-PTx を投与したところ、野生型マウスに比べて発咳数が半分以下に低下することがわかった。このことから、B2R と TRPV1 は同一の系路上で LOS-Vag8-PTx が誘発する咳反射に関与していることが考えられた。

LOS, Vag8, PTx のそれぞれの役割をさらに解析したところ、LOS は Toll 様受容体 4 を介して感染局所でブラジキニンを生成させることがわかった。また Vag8 はブラジキニン生成過程のカリクレイン・キニン系のカスケードを負に調節する C1 エステラーゼインヒビターを阻害して、ブラジキニンの生成レベルを高めていた (図 3)。ブラジキニンは B2R に共役した GTP 結合タンパク質 Gq からプロテインキナーゼ C (PKC) を介して神経 (感覚) 細胞の TRPV1 の興奮感受性を増大させると同時に、B2R-Gi の経路でプロテインキナーゼ A による TRPV1 の感作を阻害している (すなわち Bdk は TRPV1 に対してアクセル (Gq 系路) とブレーキ (Gi 経路) を同時に掛けている)。PTx は TRPV1 の感受性を負に調節する Gi 経路 (すなわちブレーキ) を遮断して、TRPV1 の興奮性を高めることがわかった (図 3)。さらに、咳反射において負のフィードバック機構に関わると予想されているノルアドレナリン (NA) -Gi 経路も PTx で遮断される。以上の結果を総合して、図 3 で示すような百日咳の咳発作の発症機序が考えられた。

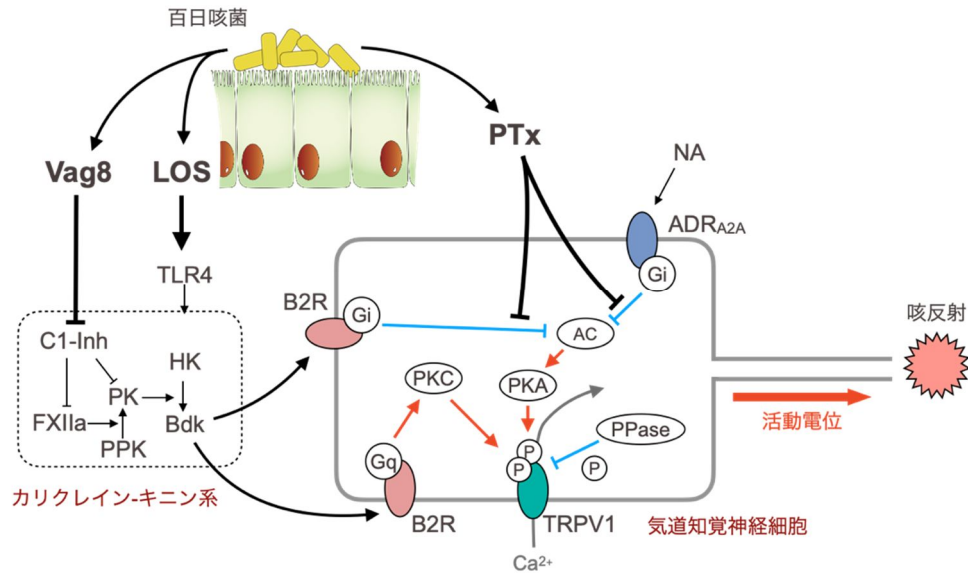


図 3：百日咳菌成分による咳反射惹起メカニズム。 TRPV1 はそのリン酸化レベルで活性状態が調整されている。PKC によりリン酸化されると易活性状態になり、そのリン酸がフォスファターゼによって脱リン酸化されると脱感作（低応答化）する。一方、PKA は TRPV1 の、PKC によってリン酸化される部位とは別の部位をリン酸化し、TRPV1 の感受性を亢進させる。LOS と Vag8 の作用によって高度に生成されたブラジキニン（Bdk）は B2R-Gq-PKC 経路で TRPV1 の刺激感受性を増大させる一方、B2R-Gi 経路で PKA の作用を抑制する。PTx は Gi を不活性化するため、この PKA 抑制が解除される。また、咳反射の負のフィードバックに関わるノルアドレナリン（NA）-Gi の経路も PTx によって阻害されるため、TRPV1 は長期間にわたって高感受性化する。C1-Inh, C1 エステラーゼインヒビター； FXIIa, 血液凝固系活性化第 XII 因子； PK, カリクレイン； PPK, プレカリクレイン； HK, 高分子キニンノーゲン； TLR4, Toll 様受容体。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hiramatsu Yukihiko, Nishida Takashi, Nugraha Dendi Krisna, Sugihara Fuminori, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Melanin Produced by Bordetella parapertussis Confers a Survival Advantage to the Bacterium during Host Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	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/mSphere.00819-21	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 Tsukamoto Kentaro, Shinzawa Naoaki, Kawai Akito, Suzuki Masahiro, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki, Yamaguchi Hisateru, Kameyama Toshiki, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Horiguchi Yasuhiko, Doi Yohei	4. 巻 11
2. 論文標題 The Bartonella autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17391-2	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 Onoda Naoki, Hiramatsu Yukihiko, Teruya Shihono, Suzuki Koichiro, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of the minimum region of Bordetella pertussis Vag8 required for interaction with C1 inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12799	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 Hiramatsu Yukihiko, Suzuki Koichiro, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Expression of small RNAs of Bordetella pertussis colonizing murine tracheas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12791	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 Teruya Shihono, Hiramatsu Yukihiro, Nakamura Keiji, Fukui-Miyazaki Aya, Tsukamoto Kentaro, Shinoda Noriko, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Ishigaki Keisuke, Shinzawa Naoaki, Nishida Takashi, Sugihara Fuminori, Maeda Yusuke, Horiguchi Yasuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 03146-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03146-19	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15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 感染動物実験から見た百日咳における脳症と咳発作
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 マウス咳発症モデルを用いた百日咳の咳発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 百日咳の咳発作はリポオリゴサッカライド、Vag8、百日咳毒素の協調作用によって起こる
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、Hiroyuki Yamaguchi、Yasuhiko Horiguchi
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、西田 隆司、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 パラ百日咳菌の産生する褐色色素メラニンの同定と機能解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba castellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松 征洋、西田 隆司、Dendi Krisna Nugraha、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella parapertussis produces melanin involved in the bacterial survival during host infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口 安彦
2. 発表標題 ボルデテラの毒素
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一郎、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 The mechanism of pertussis cough revealed by the mouse-coughing model
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一郎、堀口 安彦
2. 発表標題 宿主感染時に高発現する百日咳菌small RNAの機能解析
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松 征洋、鈴木 孝一朗、西田 隆司、堀口 安彦
2. 発表標題 マウスモデルから見た百日咳における咳発作発症機構
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉木 優生、西田 隆司、平松 征洋、堀口 安彦
2. 発表標題 新規発光システムを用いた気管支敗血症菌感染のin vivoイメージング手法の構築
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Dendi Krisna Nugraha、山口 博之、堀口 安彦
2. 発表標題 Bordetella bronchiseptica utilizes Acanthamoeba catellanii as a temporal niche
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松征洋、岡真優子、堀口安彦
2. 発表標題 Modification of Bordet-Gengou agar medium for cultivation of bordetellae
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	西田 隆司 (Nishida Takashi) (20845200)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	
研究 分担者	平松 征洋 (Hiramatsu Yukihiro) (90739210)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	

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