

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390104

研究課題名(和文)百日咳の病態発生メカニズムの解析

研究課題名(英文)Basic analysis of pathogenesis of whooping cough

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) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：百日咳菌感染における咳嗽発作の発症機構を解明する目的で、百日咳類縁菌である気管支敗血症菌を用いた感染モデルを作製した。本感染モデルは、500cfu(生菌数)の投与で百日咳に似た咳嗽発作を再現することができる。このモデルでは、高菌量の百日咳菌の経鼻投与でも咳嗽発作が再現できた。種々の気管支敗血症菌の遺伝子変異株を用いて咳嗽症状の解析を行う過程で、咳嗽発作惹起能のきわめて弱い自発変異株を分離することに成功した。本変異株と野生株の全ゲノム配列を比較したところcrg1と名付けた遺伝子が咳嗽発作に関与していることがわかった。今後は咳嗽発作機構解明に向けてcrg1遺伝子の性状と機能を解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of paroxysmal cough observed in whooping cough, *Bordetella pertussis* infection, we established an animal model that reproduce the paroxysmal cough by using *B. bronchiseptica*, which is closely related to *B. pertussis*. This model animal showed coughing after intranasal infection by 500 cfu of *B. bronchiseptica*. In the course of analyzing the *B. bronchiseptica* infection, we succeeded in isolating a mutant strain that did not induce coughing in the model animal. A comparison of the genomes of the mutant strain and the parental wild type strain revealed a single-base insertion in a gene designated *crg1*. A strain deficient in *crg1* was found not to cause the paroxysmal cough in the animals, showing that *crg1* might be involved in the paroxysmal cough. Further work is in progress to characterize the *crg1* gene.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：百日咳 気管支敗血症菌 咳嗽

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の上部気道感染によって起こる伝染性の疾病である。患者は本症で特徴的な発作性の咳嗽により無呼吸状態に陥るため、チアノーゼや痙攣さらには脳症を起こし、重篤な場合は死に至る。WHO によると、本疾患により毎年世界で約20万人-30万人が死亡している。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。百日咳は古くから知られた病気であるが、その感染成立機構はほとんどわかっていない。現行のワクチンは一定の予防効果を期待できるが、感染成立機構が不明なために、ワクチン成分(百日咳毒素や繊維状赤血球凝集素)が主要防御抗原として有効な理由も不明である。この事実は抗原変異株の蔓延が憂慮されている将来に、大きな不安材料を与えている。また、百日咳で見られる発作性咳嗽は患者に多大な負荷を強い、ときに死因に直結するが、その発症機構も不明である。そのため、臨床現場では発作性咳嗽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。

百日咳の感染・発症機構の解析が進展しない理由に、百日咳菌がヒトに特化した病原細菌であるために、感染動物モデルを確立し難いという問題が挙げられる。そこで、百日咳菌感染のモデル菌として、哺乳動物に広範な宿主域を持つ近縁種の気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) がよく利用されている。百日咳菌と気管支敗血症菌は相同性の高い一連の病原因子の遺伝子を共通して保有しており、両菌ともそれぞれの宿主に経気道的に感染し、咳嗽発作を引き起こす。これまで報告されてきた百日咳関連の感染動物モデルにはマウスが用いられてきているが、いずれも投与菌数がきわめて多いことや感染が短期間で終息すること、また咳嗽などの症状の発現に乏しいことなどから、病状を正確に再現するモデルとは言い難かった。一方、申請者らは気管支敗血症菌と種々の動物の組み合わせで、改めて本菌の感染実験スクリーニングを行い、少ない投与菌数で一定期間の感染が成立しかつ咳嗽を再現する、という条件を満たす感染動物モデルを作製することに成功し、さらに咳嗽発作の定量化観察の方法を考案した(未発表)。この動物モデルでは、多量の百日咳菌による感染においても同様の咳嗽発作が見られることも確認している(ただし感染の維持はできない)。

2. 研究の目的

本研究の目的は百日咳の主症状である発作性咳嗽の発症機構を解明することである。百日咳は百日咳菌の上部気道感染によ

て起こるヒトの呼吸器感染症である。発作性咳嗽は無呼吸状態から痙攣さらには脳症を起こして罹患者を死に至らしめる、本症重篤化の原因症状である。これまでに、申請者らは咳嗽発作を再現する動物感染モデルを確立して咳嗽を客観的に定量化することに成功し、さらに咳嗽発作を起こさない自発性変異株を得ることができた。これらの成果を基礎に、発作性咳嗽の原因となる細菌側病原因子を同定するとともに、その機能と宿主応答を解析し、咳嗽発作発症機構の全貌を解明する。本研究の成果をもって申請者は、咳嗽の原因療法の開発を通じて百日咳患者の負荷を軽減し本症の死亡率を低下させることに貢献できると考える。

3. 研究の方法

申請者らは、気管支敗血症菌感染の動物モデルを用いて種々の条件で実験を繰り返した。その過程において、感染は成立するが宿主の咳嗽発作を起こさない自発性変異株を偶発的に見出すことができた(未発表、右図)。この成果を基礎に、以下のような項目についてそれぞれ研究を実施した。

1. 感染動物モデルの咳嗽発作の観察データの収集

本研究で用いる気管支敗血症菌の感染モデルを用いて、鼻腔、上部気道、下部気道および肺に定着した気管支敗血症菌数(CFU, Colony Forming Unit)を経時的に測定して菌の消長を調べるとともに、同時に咳嗽発作の程度(一定時間における咳の回数)も経時的に調べた。

2. 咳嗽発作を起こさない気管支敗血症菌変異株(C株)の変異遺伝子のクローニング

C株と親株間での遺伝子の相違を明らかにするために、両株の全ゲノム配列を決定した。配列の異同を精査することによって、C株で変異のある遺伝子を検索した。

4. 研究成果

1. 感染動物モデルの咳嗽発作の観察データの収集

気管支敗血症菌を動物に感染させ、咳嗽発作症状を観察した。2種の異なる菌株(S798株とRB50株)を500 cfu/動物の菌量で経鼻感染させたところ、両菌株とも感染5日以内の動物に咳嗽症状を起こした。観察期間における平均咳嗽回数は両菌株とも同程度(~150回/30分)であった。ここで用いた動物種を自然宿主としない百日咳菌を高菌量(100,000,000 cfu/動物)で投与したところ、菌は一週間以内に排除されたが、感染5日から咳嗽発作が認められた。気管支敗血症菌の菌体破砕液を5日間連続投与しても、咳嗽発作が認められたが、加熱処理した菌体破砕液は咳嗽発作を起こさなかった。また、既知の病原因子遺伝子を欠失させた変異株はいずれも咳嗽発作を起こした。また、気管支敗血

症菌と百日咳菌をそれぞれ動物に感染させ、経日的に動物気道をを取り出し組織切片を作製して顕微鏡観察を行った。その結果、気管支敗血症菌の感染した気道組織では免疫細胞の浸潤が見られて明らかな炎症像を示したのに対し、百日咳感染の気道では明らかな細胞浸潤は認められなかった。

2. 咳嗽発作を起こさない C 株の変異遺伝子のクローニング

気管支敗血症菌の C 株と野生型株の全ゲノム配列を決定し、その異同から C 株に特有の変異遺伝子を探索したところ、3 種の遺伝子に変異のあることがわかった。野生型株のこれらの遺伝子をそれぞれ人為的に欠失させて、咳嗽発症能を調べたところ、これらのうち 1 遺伝子 (*crg1*: cough-relating gene) を欠失させると、咳嗽発作が起こらないことがわかった。

crg1 の塩基配列と先行研究の結果から *crg1* は、種々の遺伝子の発現を制御する因子であることが推定できた。*crg1* を人為的に欠失させた *crg1* 株を作製し、動物感染実験に供したところ、*crg1* 株は C 株と同様に動物に咳嗽発作を起こさないことがわかった。次に *crg1* の下流で発現制御を受け、かつ咳嗽発作に関与する遺伝子を探索するために、*crg1* 株と野生型株の遺伝子発現パターンをマイクロアレイによって比較した。任意に設定した基準に従って、野生型株で発現するが *crg1* 株で発現しないと考えられた遺伝子を 40 遺伝子程度リストアップした。それぞれの遺伝子の欠損変異株をさらに作製し、現在、それぞれの咳嗽惹起能を調べているところである。

本研究により、世界に先駆けて、百日咳菌や気管支敗血症菌などのボルデテラ属細菌の咳嗽発作惹起能に関わる細菌側要因に遺伝子レベルで迫ることができた。今後は *crg1* の下流の遺伝子を解析し、それぞれの機能を解析することにより、咳嗽発作の原因となる病原因子の同定を目指し、その成果を基礎に咳嗽発作の発症メカニズムを解明する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1) Orth JHC, Fester I, Siebert P, Weise M, Lanner U, Kamitani S, Tachibana T, Wilson BA, Schlosser A, Horiguchi Y, Aktories K (2013) Substrate specificity of *Pasteurella multocida* toxin for subunits of heterotrimeric G proteins. *FASEB J* **27**: 832-842. doi: 10.1096/fj.12-213900. (査読有り)

2) Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Fukui-Miyazaki A, Toshima H, Abe H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Karatani H, Horiguchi Y (2011) Crystal Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Displays Features of {beta}-Pore-forming Toxins. *J Biol Chem* **286**: 19549-19555 doi: 10.1074/jbc.M111.228478. (査読有り)

3) Kamitani S, Ao S, Toshima H, Tachibana T, Hashimoto M, Kitadokoro K, Fukui-Miyazaki A, Abe H, Horiguchi Y (2011) Enzymatic actions of *Pasteurella multocida* toxin detected by monoclonal antibodies recognizing the deamidated alpha subunit of the heterotrimeric GTPase G(q). *FEBS J* **278**: 2702-2712 doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08197.x. (査読有り)

4) Fukui-Miyazaki A, Ohnishi S, Kamitani S, Abe H, Horiguchi Y (2011) *Bordetella* dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. *Microbiol Immunol* **55**: 154-159 doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00300.x. (査読有り)

[学会発表](計 20 件)

1) 岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2014). プタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会; 2014.3.26; 東京江戸川区 タワーホール船堀.

2) 安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 岡田圭祐, 堀口安彦 (2014). IVET-IP 法: ラット感染中の気管支敗血症菌の遺伝子発現プロファイル解析. 第 87 回日本細菌学会総会; 2014.3.26; 東京江戸川区 タワーホール船堀.

3) 堀口安彦 (2013). In vivo expressed tag immunoprecipitation 法による感染時の細菌遺伝子発現の網羅的解析. 第 36 回分子生物学会; 2013.12.4; 神戸市 ポートアイランド.

4) 西川明芳, 安倍裕順, 岡田圭祐, 神谷重樹, 福井理, 堀口安彦 (2013). 気管支敗血症菌が宿主体内で発現する新たな病原因子候補. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会; 2013.11.16. 大阪大学 微生物病研究所.

5) 岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2013). プタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会; 2013.11.16. 大阪大学 微生物病研究所.

6) 岡田圭祐, 安倍裕順, 小椋義俊, 林哲也, 阿部章夫, 桑江朝臣, 堀口安彦 (2013). プタ由来気管支敗血症菌 S798 株のゲノム解析. 第7回細菌学若手コロッセウム; 2013.8.8. 広島県三原市 広島エアポートホテル.

7) 福井理, 戸嶋ひろ野, 安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦 (2013). ボルデテラ属細菌が産生するアデニレートサイクラーゼ毒素 (ACT) の菌種間における毒素作用の違いについて. 第60回毒素シンポジウム; 2013.7.18. 兵庫県宍粟市 楓香荘.

8) Horiguchi Y (2013). The pore-forming mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin. ETOX16; 2013.6.25; Freiburg Germany Hotel Schloss Reinach.

9) Horiguchi Y (2013). Attempts to understand how the pathogenic bordetellae exert specific pathogenicity in specific hosts. 第155回日本獣医学会; 2013.3.29; 東京大学駒場キャンパス.

10) Nishikawa S, Abe H, Okada K, Kamitani S, Fukui A, Horiguchi Y (2013). A putative virulence factor produced by *Bordetella*. 第86回日本細菌学会; 2013.3.18; 千葉市幕張メッセ.

11) Abe H, Kamitani S, Fukui A, Okada K, Horiguchi Y (2013). IVET-IP Analysis Monitoring Temporal Gene Expression Profiles of *Bordetella bronchiseptica* in Rats. 第86回日本細菌学会; 2013.3.18; 千葉市幕張メッセ.

12) 堀口安彦 (2012). 「なぜ百日咳菌はヒトだけに感染して激しい咳発作を起こすのか？」 その基礎細菌学的アプローチ. 第39回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会; 2012.11.9; 大阪市天王寺区役所.

13) Horiguchi Y (2012). A functional difference in adenylate cyclase toxins produced by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium; 2012.10.25; National Center of Sciences Building, Tokyo, .

14) 堀口安彦 (2012). ボルデテラ属細菌の感染特異性決定機構解析へのアプローチ. 第79回日本細菌学会北海道支部学術集会; 2012.8.28; 北海道帯広市とかちプラザ.

15) Horiguchi Y (2012). The molecular action of *Clostridium perfringens*

enterotoxin, a pore-forming toxin. 日本細菌学会; 2012.3.27; 長崎市長崎ブリックホール.

16) 戸嶋ひろ野, 福井理, 安倍裕順, 神谷重樹, 堀口安彦 (2012). Different activities of adenylate cyclase toxins of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. 日本細菌学会; 2012.3.27; 長崎市長崎ブリックホール.

17) 安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦 (2011). 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 日本分子生物学会; 2011.12.14; 横浜市パシフィコ横浜.

18) 安倍裕順, 神谷重樹, 福井理, 戸嶋ひろ野, 堀口安彦 (2011). 感染成立過程で発現する病原細菌遺伝子の網羅的解析法の開発. 日本細菌学会関西支部総会; 2011.11.19; 大阪市大阪府立大学中百舌鳥キャンパス.

19) Horiguchi Y, Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Abe H (2011). The pore-forming mechanism of *clostridium perfringens* enterotoxin targeting claudins, components of the tight junction. 日本生化学会; 2011.9.23; 京都市京都国際会議場.

20) Horiguchi Y, Kitadokoro K, Nishimura K, Kamitani S, Abe H (2011). The pore-forming mechanism of *clostridium perfringens* enterotoxin targeting claudins, components of the tight junction. *International Union of Microbiological Societies 2011*; 2011.9.7; 札幌市札幌コンベンションセンター.

〔図書〕(計1件)

1) Horiguchi Y (2012) Swine Atrophic Rhinitis Caused by *Pasteurella multocida* Toxin and *Bordetella* Dermonecrotic Toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* (Springer) **361**: 113-129
doi: 10.1007/82_2012_206

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

神谷 重樹 (KAMITANI, Shigeki)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：60379089
(H25.3.31 まで参画)

安倍 裕順 (ABE, Hiroyuki)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00379265

(3) 連携研究者

なし